



Universidad Autónoma de Madrid.

Programa de Doctorado en Biociencias Moleculares.

**El papel del sustrato del receptor de la insulina  
tipo 2 (IRS2) en el desarrollo de la enfermedad  
colestásica.**

Andrea Villar Lorenzo

Madrid, 2018

Departamento de Bioquímica.

Facultad de Medicina.



Universidad Autónoma de Madrid



**El papel del sustrato del receptor de la insulina tipo 2 (IRS2) en el desarrollo de la enfermedad colestásica.**

Memoria de Tesis Doctoral presentada por:

**Andrea Villar Lorenzo**

Madrid, 2018

Licenciada en Biología Molecular y Bioquímica, para optar al grado de Doctora por la universidad Autónoma de Madrid.

Tesis Doctoral dirigida por:

**Dra. Águeda González Rodríguez**

**Dra. Ángela María Martínez Valverde**

Instituto de Investigaciones Biomédicas Alberto Sols CSIC-UAM.

Madrid 2018



La directora **Dra. Ángela María Martínez Valverde** y la codirectora **Dra. Águeda González Rodríguez** certifican que **Andrea Villar Lorenzo**, licenciada en Biología Molecular y Biotecnología por la Universidad de Santiago de Compostela y licenciada en Bioquímica por la Universidad Autónoma de Madrid, ha realizado el trabajo titulado: **“El papel del sustrato del receptor de la insulina tipo 2 (IRS2) en el desarrollo de la enfermedad colestásica”** bajo su dirección en el Instituto de Investigaciones Biomédicas Alberto Sols para optar al grado de Doctor por la Universidad Autónoma de Madrid.

Revisado el presente trabajo, expresan su conformidad para la presentación del mismo considerando que reúne los requisitos necesarios para ser sometido a discusión ante el tribunal correspondiente.

Firmado, para que conste a todos los efectos, en Madrid, a 4 de Septiembre de 2018.

Fdo. **Dra. Ángela M<sup>a</sup>  
Martínez Valverde**

Directora de Tesis.  
Investigadora Científica, CSIC

Fdo. **Dra. Águeda González Rodríguez**  
Codirectora de Tesis.

Investigadora Miguel Servet,  
Hospital Universitario Santa Cristina

Vº Bº Tutora

**Dra. Paloma Martín Sanz**  
Investigadora Científica, CSIC



Esta memoria de tesis ha sido realizada con la ayuda de la Beca de Formación de Personal Investigador (FPI) con referencia BES-2013-063982 en el Departamento de Metabolismo y Señalización Celular del Instituto de Investigaciones Biomédicas Alberto Sols en colaboración con la Unidad de Investigación del Hospital Universitario Santa Cristina (Instituto de Investigación Sanitario del Hospital Universitario de la Princesa)

**A mis padres.**

**A María.**

**Y a Elena.**

**“Para alcanzar lo que nunca has  
tenido, tendrás que hacer lo que  
nunca has hecho” *Mireia Belmonte.***

## **AGRADECIMIENTOS**

Y llegó el gran momento, el momento de agradecer y de celebrar la recompensa a tanto esfuerzo. No quisiera dejarme a nadie sin nombrar. Esta tesis lleva mi nombre en la portada, pero no sería realidad ni posible sin cada una de las personas que aparecen en estas páginas.

En primer lugar, muchas gracias Ángela, gracias por haberme escogido a mí, por haber visto a aquella chica de hace 6 años con la mayor ilusión del mundo por coger una pipeta, espero haber estado a la altura. Gracias.

Y en segundo lugar, gracias Águeda, gracias por acogirme, gracias por enseñarme la fuerza y el valor de afrontar cada nuevo reto y por el currazo que te has marcado. ¡*Valar Morghulis!*

Y en tercer lugar, agradecer a Carmelo, las buenas palabras que siempre tiene.

No me quisiera olvidar de mis chicas del 1.14 / 1.10. Que gran época y que grandes recuerdos que me han acompañado en estos 4 años. Vir, tú me has enseñado lo más básico, con la mayor paciencia que te define y con la más grande de las sonrisas, eres muy grande “Virchu” y mi ejemplo más claro en el que se ha inspirado todo el trabajo. Ester, que gran placer ha sido vivir esto muy cerquita de ti, no sólo nuestras tesis, ya sabes dónde estoy, cuando sea. M<sup>a</sup> Ángeles, gracias por cuidarme como a una niña todo el tiempo que hemos coincidido. Anita, no tengo palabras que puedan resumir lo agradecida que estoy de haber coincidido contigo en esta vida, no sabes lo grande que eres, no tienes ni idea de lo que eres capaz de ayudar a las personas, gracias de todo corazón, por cada palabra de ánimo, por cada llamada, por cada minuto de ciencia y por ser tan auténtica como sólo tú sabes serlo. Mi Beíta (mi “Bufi”), cuánto me has ayudado, cuántos consejos, cuántas conversaciones en la sala de personal del IIB, pero sobretudo cuántas risas y cuantísima ciencia. Lo siento Bea, sabes que jamás he sido capaz de hacerte caso y aquí la tienes, sé que hoy estás más que orgullosa de mí. ;). Esta tesis sin vosotras, de verdad que no hubiese sido posible. INFINITAS GRACIAS, AMIGAS.

Y no me quiero olvidar de Patri, que gran ejemplo eres para todo el que trabaje contigo. Ya sabes, cuando quieras nos hacemos otros carbonilos, pero esta vez llevo la cena ¿eh? Gracias mil muchacha y muchísima suerte en todo lo que te propongas. Laurer, al final lo hemos conseguido, ¿eh?

Vamos con la gente del “HolyCristin” Dani T, Dani C y Esther F, gracias chicos, por todas y cada una de las veces que me habéis preguntado y dado ánimo. Flori, ya no te queda nada, gracias por todo, por volcarte cada vez que te he pedido ayuda y por interesarte tantísimo en esta tesis. El bueno de Antonio, mi Toñete, aquí no podías



faltar, dale fuerte amigo, que lo vas a hacer genial. Gracias por todo chicos, sois increíbles.

A mis “Maricármenes”, por supuesto: Pati, mucho ánimo y sabes que aquí me tienes cuando necesites ayuda, vas a hacer una tesis espectacular, ¡dale caña rubia!. Esther, que si... que no me olvido de ti. Gracias por todo, de verdad, por tu paciencia (y la mía también), gracias por toda la ayuda y el trabajo bien hecho. Ánimo y a seguir corriendo como tú sabes, (no me echéis mucho de menos) ¡Ya puedes llorar!. Miri, la “Maricarmen” mayor del reino, cuánto me has ayudado a seguir adelante en estos últimos dos años y cuanto te he echado de menos los últimos meses, aquí estoy para lo que necesites. Ya lo sabes, amiga.

A mis chicas de Santiago; Eva, Yai, Alba. No importan los kilómetros que nos separen, ni los años que pasen sin vernos, cuando nos juntamos parece que jamás me fui de Compostela, siempre os habéis preocupado de cada paso que he dado y aquí no podíais faltar. Esto tenemos que celebrarlo tarde o temprano, ¡Querovos pequeñas!.

Y ahora viene lo más importante, mi familia, mi motor.

Papá, Mamá, lo he conseguido, he llegado lo más lejos que podía. Y todo ello por vosotros, me enseñasteis que el límite no existía para mí. Sois los mejores padres que una hija puede tener. Esta tesis es vuestra, cada página. Gracias, por todo vuestro esfuerzo incansable. Os quiero.

Mi sombrita blanca, aquella que me acompaña allá a donde voy, la que me espera todas las tardes con el más puro amor que pueda existir y la que se sienta a mis pies en cada ratito que me siento al PC. Cuantísimo te quiero Leia.

Bea, Iván, gracias por todas las veces que os habéis interesado por cómo iba todo, ¡sois muy grandes “Cus”!. Y por supuesto mis sobrinos, Eva y Marcos. Jamás dejéis de perseguir vuestros sueños. Jamás. ¡Os quiero chicos!. (Esto se merece otra noche de pizza, ¿no?)

María, a ti te debo todo. Todo. Me has dado lo más bonito que se puede tener en la vida. Has estado cada día escuchándome, dándome fuerzas en cada momento de flaqueza, gracias por cada momento de comprensión y por cada instante de ánimo. Juntas podemos con todo y juntas podremos con todo. Somos invencibles. Como siempre... *te todo infinito*.

Elena, mi pequeña, mi bichito de la luz, ojalá que algún día cuando abras este libro y leas estas páginas puedas estar tan orgullosa tú de mí, como yo lo estoy de ti y lo estaré el resto de mi vida. Jamás dejes de sonreír, jamás dejes de brillar con esa luz

## AGRADECIMIENTOS

por esos ojazos que son el faro que guía a tus madres. Ahora me toca a mí enseñarte, que el límite no existe para ti. Te quiere, mami.

A vosotros dos, que lleváis mirándome tantos años ya desde ahí arriba. Os sigo echando muchísimo de menos. Y cuantas veces me he acordado a lo largo de estos años de lo orgullosos que estaríais de mí. Ojalá pudiese volver a abrazaros otra vez y deciros cuanto os quiero, abuela y abuelo. ¡Vuestro mayor deseo se ha hecho realidad!.

¡GRACIAS A TODOS!

*Andre*

**RESUMEN/ABSTRACT**

El daño hepatocelular es el principal desencadenante de la respuesta reparadora en el hígado que conduce a la fibrosis hepática. El sustrato del receptor de la insulina tipo 2 (IRS2) es una proteína fundamental de la ruta de señalización de la insulina que modula el metabolismo hepático. Sin embargo, no se conoce su papel en el desarrollo de la fibrosis en el hígado. En esta Tesis Doctoral se ha investigado el impacto de la deficiencia en IRS2 en el estrés hepatocelular ante el daño colestásico en el hígado. Para ello, ratones hembra de genotipo salvaje (WT) y deficientes en IRS2 (IRS2KO) se sometieron a una ligadura del conducto biliar (BDL) y tras el sacrificio en diferentes días tras la cirugía se realizaron análisis histológicos, bioquímicos y moleculares de los principales marcadores fibrogénicos y proinflamatorios. Los ratones IRS2KO desarrollaron lesiones histológicas menos severas y presentaron menores elevaciones de los marcadores bioquímicos de daño biliar que los ratones controles (WT) a los 3 y 7 días post-BDL. La expresión hepática de marcadores proinflamatorios y fibrogénicos se encontraba disminuida en los ratones IRS2KO en comparación con los WT a los 3 y 7 días post-BDL. Además, los niveles de hemoxigenasa 1, un marcador de la respuesta antioxidante desencadenada ante un estrés oxidativo, fueron menores en los ratones IRS2KO sometidos a BDL. Sin embargo, estas diferencias entre los genotipos no eran detectables los 28 días después de la operación. Se exploró si la ausencia de IRS2 afectaba a la activación de las células estelares hepáticas (HSC) humanas LX2 tras la estimulación con el factor de crecimiento insulínico tipo 1 (IGF1). Se encontró que la ausencia de IRS2 redujo su activación por el IGF1, preservando el fenotipo quiescente y mostrando una reducida expresión de los marcadores fibrogénicos, colágeno tipo 1 y  $\alpha$ SMA. De hecho, en ausencia de IRS2 la fosforilación de ERK1/2 y la expresión de MMP9 inducidas por el IGF1 se encontraron disminuidas. Asimismo, se analizó el papel de la vía de señalización IGF1R-ERK1/2-MMP9 en la activación de las HSC. Para ello, las células LX2 se trataron con PD98059, inhibidor farmacológico de la activación de ERK1/2, y a continuación se estimularon con IGF1. En estas condiciones se impidió la activación de las HSC por el IGF1, resultados que se reprodujeron tras el silenciamiento génico de IRS2. Por último, se estudió la modulación de los componentes del sistema IGF1/IGF1R encontrando que tras la BDL los niveles de ARNm del IGF1R aumentaban mientras que los de los IRS disminuían. Además, la expresión de MMP9 se encontró significativamente más elevada en los ratones WT que en los ratones IRS2KO. Nuestros resultados indican que el IRS2 contribuye a la progresión del daño hepático producido por la colestasis ya que su deficiencia reduce la respuesta inflamatoria y fibrogénica en un modelo preclínico de esta patología debido, al menos en parte, a la menor activación de las HSC inducida por el IGF1.

Hepatocellular injury is the major triggering event of the wound healing response that leads to liver fibrosis. Insulin receptor substrate 2 (IRS2) is a key downstream mediator of insulin signaling pathway with a major role in liver metabolism. However, its effects on liver fibrosis have been poorly studied. In this Thesis we have investigated whether IRS2 deficiency influences the hepatocellular stress responses of the liver triggered by cholestatic injury. For that goal, bile duct ligation (BDL) was performed in wild-type (WT) and IRS2-deficient (IRS2KO) female mice. Histological and biochemical analysis, inflammatory and fibrogenic responses were evaluated in livers from mice at 3, 7 and 28 days following BDL. Although no differences between genotypes were found at 28 days post-BDL, IRS2KO mice displayed less BDL-induced histological alterations in the liver, including hepatocyte damage and excess deposition of extracellular matrix components compared to WT mice at 3 and 7 days post-BDL. Surprisingly, no differences in total bile acid content accumulated after BDL were found, although the percentage of the different species of bile acid gathered in the gallbladder was different between genotypes. Moreover, hepatic expression of fibrogenic and proinflammatory markers was reduced in IRS2KO mice compared to WT animals after 3 and 7 days of the BDL. Interestingly, hemeoxygenase 1 expression, used as a marker of oxidative stress, was also down-regulated in livers lacking IRS2. Next, we explored whether activation of human hepatic stellate cells (HSC) LX2 induced by IGF1 is modulated by IRS2. Stable silencing of IRS2 significantly reduced IGF1 activation of LX2 since cells preserved almost the same quiescent phenotype than untreated cells and showed a reduced expression of  $\alpha$ -SMA and collagen 1. Indeed, IRS2 knockdown impaired the phosphorylation of ERK1/2 as well as the induction of MMP9 upon IGF1 challenge. Lastly, we delineate the role of IGF1R-ERK1/2-MMP9 axis in HSC activation. To achieve this, we pre-treated LX2 with IGF1 combined with PD98059, a well-known inhibitor of ERK1/2 activation. Under these conditions IGF1-mediated activation of LX2 cells was abolished. Similar results were obtained upon IRS2 silencing. Lastly, the analysis of the components of the IGF1/IGF1R system in the two genotypes of mice revealed that hepatic levels of IGF1R mRNA significantly increased while IRS mRNA levels decreased after BDL challenge. Moreover, the expression of MMP9 after BDL was higher in WT mice than in those animals lacking IRS2. Taken together, our results indicate that IRS2 contributes to the progression of cholestatic liver injury since its deficiency reduced both inflammatory and fibrogenic responses triggered by BDL, at least in part by reducing HSC activation induced by IGF1.

## ÍNDICE

<b>CLAVE DE ABREVIATURAS.....</b>	<b>29</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>35</b>
<b>1.1 El hígado y la vesícula biliar. ....</b>	<b>37</b>
1.1.1 Anatomía del hígado y la vesícula biliar .....	37
1.1.2 La función del hígado.....	37
1.1.3 La función de la bilis. ....	38
1.1.4 Histología hepática. ....	38
<b>1.2 Los ácidos biliares: síntesis y enfermedades colestásicas. ....</b>	<b>39</b>
1.2.1 Síntesis de ácidos biliares primarios. ....	39
1.2.2 Síntesis de ácidos biliares secundarios. ....	40
1.2.3 El papel de los ácidos biliares en el daño hepático .....	41
1.2.4 Enfermedades colestásicas. ....	42
<b>1.3 La inflamación durante proceso fibrogénico en el hígado. ....</b>	<b>43</b>
<b>1.4 Activación de las HSC y su relación con las enfermedades colestásicas. ....</b>	<b>44</b>
<b>1.5 La regulación de la matriz extracelular por las metaloproteinasas de la matriz extracelular (MMP) y su relación con el proceso fibrogénico. ....</b>	<b>45</b>
1.5.1 Las MMP en el hígado sano. ....	45
1.5.2 Las MMP en patologías hepáticas. ....	46
<b>1.6 Papel de los sustratos del receptor de la insulina (IRS) como mediadores clave de la ruta de señalización de la insulina/factor de crecimiento similar a la insulina 1 (IGF1). ....</b>	<b>46</b>
1.6.1 El IRS1 .....	47
1.6.2 El IRS2. ....	48
1.6.3 La ruta de la señalización de la insulina/IGF1 en el hígado. ....	49
<b>1.7 Modelos animales deficientes en IRS1 e IRS2. ....</b>	<b>52</b>
1.7.1 El ratón deficiente en IRS1 (IRS1KO).....	52
1.7.2 El ratón deficiente en IRS2 (IRS2KO).....	52
1.7.3 Fenotipo de los ratones deficientes en IRS1 o IRS2 de manera específica en el hígado (L-IRS1KO o L-IRS2KO).....	54
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>57</b>
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>61</b>
<b>3.1 Colonia de ratones deficientes en el gen Irs2 .....</b>	<b>63</b>
3.1.1 Genotipado de la colonia de ratones deficientes en el gen Irs2. ....	63
3.1.2 Experimentación In vivo. ....	64
<b>3.2 Histología de las muestras de tejido hepático .....</b>	<b>65</b>
3.2.1 Tinciones histológicas. ....	66
3.2.2 Análisis histológico de las muestras hepáticas .....	68
<b>3.3 Determinación de ácidos biliares presentes en el líquido biliar por cromatografía líquida. ....</b>	<b>68</b>
<b>3.4 Cultivos celulares. ....</b>	<b>69</b>
3.4.1 Línea celular LX2 .....	69
3.4.2 Procedimientos experimentales con la línea celular LX2. ....	70
<b>3.5 Análisis de proteínas.....</b>	<b>72</b>

3.5.1	Análisis de proteínas mediante Western-Blot .....	72
3.5.2	Análisis de la expresión de proteínas mediante inmunofluorescencia. ....	75
<b>3.6</b>	<b>Análisis de ARN total y PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR). ....</b>	<b>76</b>
3.6.1	Extracción ARN total de tejidos y células.....	76
3.6.2	Transcripción reversa seguida de PCR. ....	77
3.6.3	Análisis mediante PCR cuantitativa en tiempo real qPCR. ....	78
<b>3.7</b>	<b>Análisis estadístico.....</b>	<b>80</b>
<b>4.</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>81</b>
<b>4.1</b>	<b>Caracterización del proceso fibrótico asociado a colestasis biliar en un modelo murino deficiente en el gen <i>Irs2</i> e identificación de las dianas clave del proceso fibrogénico que resultan afectadas en este modelo. ....</b>	<b>83</b>
4.1.1	La ausencia de IRS2 produce un retraso en la aparición del proceso fibrótico en el hígado de los ratones a los 3 días post-BDL. ....	83
4.1.2	La falta de IRS2 produce un retraso en el daño biliar y en el desarrollo del proceso fibrótico en ratones a los 7 días post-BDL. ....	85
4.1.3	La deficiencia en IRS2 no altera el grado de fibrosis alcanzado a los 28 días después de la BDL. ....	87
4.1.4	La ausencia de IRS2 modifica la síntesis de diferentes ácidos biliares acumulados en la vesícula biliar tras la BDL. ....	90
4.1.5	La falta de IRS2 modifica la expresión génica de los principales marcadores fibrogénicos en el hígado. ....	91
4.1.6	La ausencia de IRS2 disminuye el componente inflamatorio asociado al proceso fibrótico debido a la colestasis biliar. ....	94
<b>4.2</b>	<b>Estudio mecanístico de la ruta de señalización que conlleva a la activación de las HSC inducida por el IGF1: evaluación del papel de IRS2 en este proceso celular. ....</b>	<b>96</b>
4.2.1	El IGF1 activa las HSC y promueve su diferenciación a miofibroblastos. ....	96
4.2.2	El silenciamiento de IRS2 en la línea celular LX2 revierte la activación y diferenciación de las HSC hacia miofibroblastos inducidas por el IGF1. ....	98
4.2.3	El bloqueo de la ruta de señalización mediada por ERK inhibe la activación de las HSC inducida por el IGF1. ....	101
<b>4.3</b>	<b>La ausencia de IRS2 modifica la expresión génica de IRS1 y MMP9 en ratones sometidos a BDL. ....</b>	<b>105</b>
<b>5.</b>	<b>DISCUSIÓN .....</b>	<b>109</b>
<b>6.</b>	<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>121</b>
<b>7.</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>125</b>
<b>8.</b>	<b>ANEXO .....</b>	<b>135</b>



## **CLAVE DE ABREVIATURAS**

<b>HSC</b>	Células estelares hepáticas
<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>ADNc</b>	ADN complementario
<b>AKT</b>	Proteína quinasa B
<b>AP1</b>	Proteína activadora 1
<b>BDL</b>	Ligadura del ducto biliar, del inglés "Bile Duct Ligation"
<b>BMP</b>	Proteína morfogénica ósea, del inglés "Bone Morphogenetic Protein"
<b>CA</b>	Ácido cólico
<b>CBL</b>	Del inglés "Cas-Br-M (murine) ecotropic retroviral transforming sequence homologue"
<b>CBP</b>	Cirrosis biliar primaria
<b>CCl<sub>4</sub></b>	Tetracloruro de Carbono
<b>CDC</b>	Ácido quenodeoxicólico
<b>CDCA</b>	Ácido quenedesoxicólico
<b>CSP</b>	Cirrosis esclerosante primaria
<b>CYP27A1</b>	Esterol 27-hidroxilasa
<b>CYP7A1</b>	Colesterol 7 $\alpha$ -hidroxilasa
<b>CYP7B1</b>	Oxiesterol 7 $\alpha$ -hidroxilasa
<b>CYP8B1</b>	Esteroides 12 $\alpha$ hidroxilasa
<b>DCA</b>	Ácido desoxicólico
<b>DMT2</b>	Diabetes Mellitus tipo 2
<b>dominio PH</b>	Dominio con homología a pleckstrina
<b>dominio PTB</b>	Dominio de unión a residuos fosfotirosina
<b>ECM</b>	Matriz extracelular, del inglés "Extracellular Matrix"
<b>EGF</b>	Factor de crecimiento epidérmico, del inglés "Epidermal Growth Factor"
<b>EMT</b>	Transición epitelio-mesénquima, del inglés "Epithelial to Mesenchymal Transition"
<b>ERK</b>	Quinasas reguladoras de señales extracelulares
<b>FBS</b>	Suero fetal bovino
<b>Foxo1</b>	Del inglés "Forkhead Box O1"
<b>GAB 1/2</b>	Del inglés "Grb-2-associated binder-1/2"
<b>GOT</b>	Glutámico oxalacetático transaminasa
<b>GSK3<math>\beta</math></b>	Glucógeno sintasa quinasa 3
<b>GUDC</b>	Ácido glucoursodeoxicólico
<b>H&amp;E</b>	Hematoxilina- Eosina
<b>HCA</b>	Ácido hialocólico
<b>HDCA</b>	Ácido hiodeoxicólico
<b>HSC</b>	Célula estelar hepática, del inglés "Hepatic Stellate Cell"
<b>IFN<math>\gamma</math></b>	Interferón gamma
<b>IGF1</b>	Factor de crecimiento similar a la insulina tipo 1
<b>IGF1R</b>	Receptor de factor de crecimiento similar a la insulina tipo 1
<b>IL</b>	Interleuquina
<b>IR</b>	Receptor de insulina
<b>IRS1</b>	Sustrato del receptor de la insulina tipo 1
<b>IRS2</b>	Sustrato del receptor de la insulina tipo 2
<b>IRS2KO</b>	Ratones deficientes en en gen <i>Irs2</i>
<b>JNK</b>	Proteína quinasa c-Jun N-terminal
<b>KRLB</b>	Dominio de unión a quinasa reguladora, del inglés "kinase regulatory-loop"

	binding"
<b>LCA</b>	Ácido litocólico
<b>LPS</b>	Lipopolisacárido bacteriano
<b>MAPK</b>	Proteína quinasa activada por mitógenos
<b>MDCA</b>	Ácido murideoxicólico
<b>MEK</b>	Proteína quinasa quinasa activada por mitógenos
<b>miARNs</b>	Micro ARNs
<b>MMP</b>	Metaloproteinasas de matriz extracelular
<b>MOI</b>	Factor de multiplicidad de infección
<b>mTORC2</b>	Complejo sensible a rapamicina
<b>NMB</b>	Glicoproteína transmembrana
<b>NPC</b>	Células no parenquimales
<b>p</b>	Coeficiente de correlación de Pearson
<b>PAI1</b>	Inhibidor del activador del plasminógeno 1
<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa
<b>PDGF</b>	Factor de crecimiento derivado de plaquetas
<b>PDK1</b>	Proteína quinasa dependiente de fosfoinosítidos 1
<b>PFA</b>	Paraformaldehído
<b>PI(3,4)P2</b>	Fosfatidil inositol 3,4 difosfato
<b>PI(3,4,5) P3</b>	Fosfatidil inositol 3,4,5 trifosfato
<b>PI3K</b>	Fosfatidilinositol 3 quinasa
<b>PKC</b>	Proteína quinasa C
<b>PTP1B</b>	Proteína tirosina fosfatasa 1B
<b>qHSC</b>	Célula estelar hepática quiescente
<b>ROS</b>	Especies reactivas del oxígeno
<b>RT-qPCR</b>	PCR cuantitativa a tiempo real
<b>SBE</b>	Región de unión a Smad
<b>SEM</b>	Error estándar de la media
<b>SH2</b>	Dominio con homología a Src 2
<b>SHB2</b>	Del inglés "Src homology-2 domain containing protein B"
<b>SHC</b>	Del inglés "Src-homology-2-containing protein"
<b>SPE</b>	Extracción de fase sólida
<b>TGFβ</b>	Factor de crecimiento transformante β
<b>TGFβRI</b>	Receptor del factor de crecimiento transformante β tipo 1
<b>TGFβRII</b>	Receptor del factor de crecimiento transformante β tipo 2
<b>TIMP</b>	Inhibidor de tejido de metaloproteinasas
<b>TLC</b>	Ácido Taurolitocólico
<b>TLR</b>	Receptores tipo Toll
<b>TMC</b>	Tricrómico de Masson
<b>TNFα</b>	Factor de necrosis tumoral
<b>UDCA</b>	Ácido ursodeoxicólico
<b>WB</b>	Western Blot
<b>WT</b>	Fenotipo salvaje
<b>Zona PP</b>	Zona periportal
<b>Zona PV</b>	Zona perivascular
<b>αSMA</b>	α Actina de músculo liso
<b>α-MCA</b>	Ácido murocólico α
<b>β-MCA</b>	Ácido murocólico β

**$\omega$ -MCA**      Ácido murocólico  $\omega$

## **1. INTRODUCCIÓN**

## **1.1 El hígado y la vesícula biliar.**

### **1.1.1 Anatomía del hígado y la vesícula biliar**

El hígado y la vesícula biliar están situados en la parte superior derecha del abdomen y se conectan entre sí por medio de las vías biliares, conductos que desembocan en el duodeno, primer segmento del intestino delgado [1]. Aunque el hígado y la vesícula biliar comparten algunas funciones, estos órganos son muy distintos.

Las células hepáticas producen la bilis, la cual circula por el interior de unos pequeños canales llamados canalículos biliares. Estos conductos se fusionan y forman canales cada vez más grandes hasta formar finalmente los conductos hepáticos derecho e izquierdo, que se unen para formar el conducto hepático común. Éste se une a un conducto conectado con la vesícula biliar, denominado conducto cístico, para formar el colédoco. El conducto pancreático se incorpora al colédoco un poco antes de entrar al intestino delgado en el esfínter de Oddi [2].

La bilis es almacenada en un órgano o compartimento llamado vesícula biliar. La vesícula biliar es un pequeño saco muscular de almacenamiento con forma de pera que contiene la bilis producida por el hígado [3]. La bilis es un líquido espeso y viscoso, de color amarillo verdoso. Se compone de sales biliares, electrolitos, pigmentos biliares, colesterol y otros lípidos [4].

### **1.1.2 La función del hígado.**

El hígado es un órgano clave en la regulación del metabolismo. Entre las funciones más importantes de éste órgano se encuentran [5]:

- Almacenamiento y liberación glucosa a la sangre dependiendo de las necesidades del organismo.
- Almacenamiento grasas de los alimentos ingeridos.
- Ensamblaje de lipoproteínas que transportan el colesterol y otros lípidos a las células del organismo.
- Síntesis colesterol y su utilización para fabricar sales biliares, siendo el responsable de la síntesis de casi la mitad del colesterol del organismo dado que el resto proviene de los alimentos ingeridos.
- Almacenamiento de hierro y vitaminas A, B<sub>12</sub> y D.
- Síntesis de proteínas del plasma sanguíneo.
- Transformación del amoníaco tóxico procedente de la descomposición de las proteínas en urea, molécula menos tóxica y que es elimina por la orina.

- Descomposición de hormonas para su posterior eliminación.
- Reciclaje de la hemoglobina de los glóbulos rojos envejecidos.
- Metabolismo del alcohol y muchos fármacos para su eliminación por la orina.

### **1.1.3 La función de la bilis.**

Las dos funciones principales de la bilis son facilitar la digestión de los nutrientes (lípidos, nutrientes y vitaminas) y eliminar del organismo ciertos productos de desecho, principalmente hemoglobina y exceso de colesterol [6].

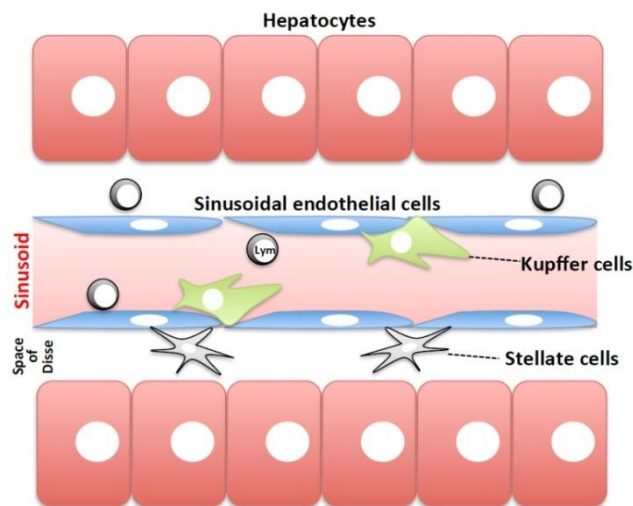
Los ácidos biliares son moléculas de señalización y agentes inflamatorios capaces de activar receptores nucleares y rutas de señalización celular que controlan el metabolismo de los lípidos y la glucosa, entre otros metabolitos. La circulación enterohepática de los ácidos biliares tiene una función fisiológica muy relevante, no sólo en la inhibición de la propia síntesis de los ácidos biliares, sino también en el control de la homeostasis lipídica de todo el organismo [6].

### **1.1.4 Histología hepática.**

La organización celular del hígado se basa en la repetición de una estructura básica denominada lóbulo hepático. Estos lóbulos tienen forma de prisma hexagonal de aproximadamente 1 mm de diámetro. Cada hexágono está compuesto por triadas portales (ducto biliar, arteria hepática y vena porta hepática) que se localizan en cada extremo del prisma. Los hepatocitos se encuentran distribuidos en el interior del lóbulo alrededor de una vena central [5].

A nivel celular, el hígado está formado por un 80% de células parenquimales que son únicamente hepatocitos [7]. El restante 20% lo constituyen células no parenquimales (NPC) entre las que se encuentran las células de Kupffer, linfocitos de Pyt, células endoteliales del sinusoides y células estelares (HSC) [7].

Los hepatocitos se agrupan en láminas o hileras y forman un entramado complejo de forma parecida a una esponja. Entre las láminas de hepatocitos circulan los capilares sinusoidales donde se localizan las células de Kupffer y los linfocitos de Pyt que poseen un calibre pequeño. Entre el endotelio de los capilares y las láminas de hepatocitos existen unos espacios denominados espacios de Disse donde se encuentran las HSC (Figura 1) [8].



**Figura 1: Tipos celulares hepáticos y su localización.**

*Tsutsui, H y col. Int J Mol Sci. 2014. [8]*

## 1.2 Los ácidos biliares: síntesis y enfermedades colestásicas.

En los humanos, el conjunto de los ácidos biliares está formado ácidos biliares primarios (ácido cólico, CA, y ácido quenodesoxicólico, CDCA) y ácidos biliares secundarios (ácido desoxicólico, DCA, y ácido litocólico, LCA). Los ácidos biliares primarios son sintetizados exclusivamente en el hígado a partir del colesterol por dos vías fundamentales, la clásica y la alternativa. Los ácidos biliares secundarios son producidos en el intestino a partir de los ácidos biliares primarios por acción de la microbiota [9, 10]. La función principal de los ácidos biliares es emulsionar las grasas y las vitaminas liposolubles [11, 12].

### 1.2.1 Síntesis de ácidos biliares primarios.

#### 1.2.1.1 *La vía clásica de síntesis de ácidos biliares primarios.*

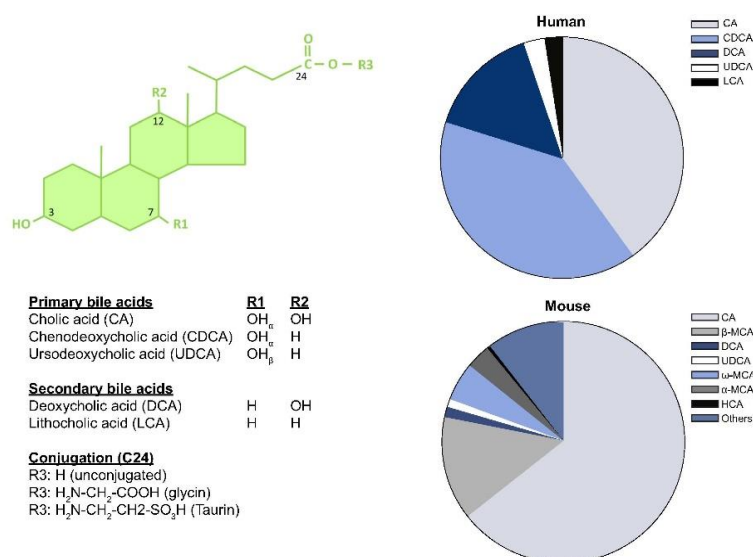
Esta vía es la encargada de producir CA y CDCA en las mismas proporciones. El primer paso está catalizado por la enzima colesterol 7 $\alpha$ -hidroxilasa que transforma el colesterol en 7 $\alpha$  hidrocolesterol. Posteriormente, el 7 $\alpha$  hidrocolesterol es convertido en el precursor común del CA y CDCA, 7 $\alpha$ -hidroxi-4-colesten-3-ona, por la acción de una deshidrogenasa (3 $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa). En el siguiente paso, el 7 $\alpha$ -hidroxi-4-colesten-3-ona es hidroxilado en el carbono 12 por la esteroide 12 $\alpha$  hidroxilasa (CYP8B1) y modificado por otras enzimas para convertirse en ácido cólico (CA). Sin la acción de la CYP8B1, el 7 $\alpha$ -hidroxi-4-colesten-3-ona es convertido en ácido quenodeoxicólico mediante diversas reacciones sucesivas [13-15].



### 1.2.1.2 La vía alternativa de síntesis de ácidos biliares primarios.

Esta vía alternativa fundamentalmente sintetiza CDCA. Los primeros dos pasos son catalizados por un enzima de la familia de las citocromo P450, concretamente la CYP27A1, que convierte el colesterol en 27-hidrocolesterol y ácido 3 $\beta$ , 7-dihidroxi-5 colestenoico. Posteriormente, la enzima CYP7B1 cataliza la hidroxilación en el carbono 7 de estos dos intermediarios, que serán convertidos a CDCA por las mismas enzimas que en la vía clásica [15-18].

La única diferencia en la síntesis de ácidos biliares entre los humanos y los ratones es que en los ratones el CDCA se convierte en ácido  $\alpha$ -muricólico y ácido  $\beta$ -muricólico (Figura 2) [19].



**Figura 2: Estructura y composición de ácidos biliares en humanos y ratones.**

**Fickert, P y col. J Hepatol. 2017. [19]**

### 1.2.2 Síntesis de ácidos biliares secundarios.

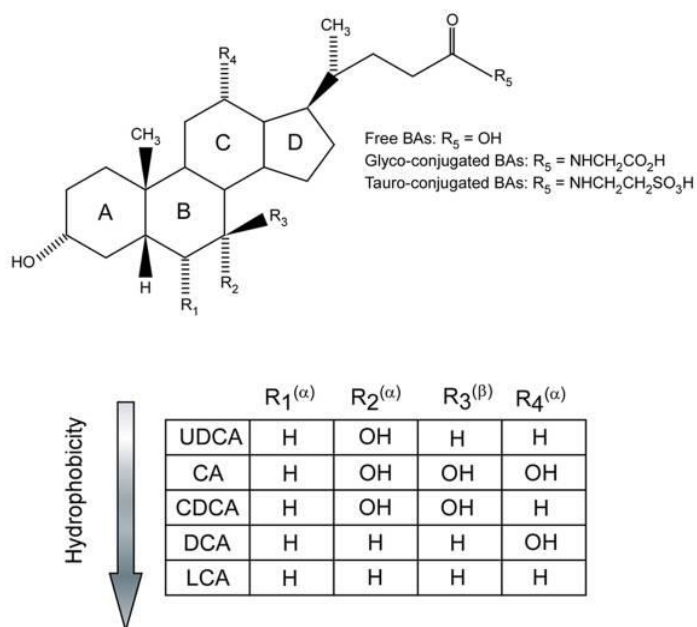
Después de la síntesis de los ácidos biliares primarios, estos se conjugan con taurina y glicina, se secretan a la bilis y se almacenan en la vesícula biliar. Después de la ingestión de los alimentos, los ácidos biliares se excretan al tracto intestinal [6, 12]. En humanos, al llegar al intestino estos ácidos biliares primarios son desconjugados y posteriormente deshidroxilados por la microbiota intestinal, convirtiendo el CA en ácido deoxicólico (DCA) y el CDCA en ácido litocólico (LCA) que constituyen los dos principales ácidos biliares secundarios en humanos (Figura 2) [6, 12].

En ratones, el CDCA se convierte en ácido ursodeoxicólico (UDCA), el  $\alpha$ -MCA en ácido hialocólico (HCA) y ácido murideoxicólico (MDCA) y el  $\beta$ -MCA en  $\omega$ -MCA y en ácido hiodeoxicólico (HDCA) [6, 12].

Alrededor del 95% de los ácidos biliares son reabsorbidos por el íleon y transportados al hígado para inhibir la actividad de la CYP7A1 y, en consecuencia, la síntesis de ácidos biliares. La alteración en la síntesis de ácidos biliares, bien en su secreción o en su transporte, puede ocasionar patologías tales como colestasis hepática, enfermedades de la vesícula biliar como la colecistitis (inflamación de la vesícula biliar) o colelitiasis (producción de cálculos biliares), así como enfermedad de hígado graso, diabetes y obesidad [6, 12].

### 1.2.3 El papel de los ácidos biliares en el daño hepático

La hidrofobicidad de los ácidos biliares es una característica que determina la toxicidad o protección de estos frente al daño hepático que se produce en las enfermedades colestásicas [20]. De hecho, dicha característica de los ácidos biliares viene marcada por el número, la posición y la orientación de los grupos hidroxilo, así como también por una amidación en el carbono 24 (C-24) de estos compuestos. Podemos ordenar estos compuestos en función de su hidrofobicidad de la siguiente manera UDCA>CA>CDCA>DCA>LCA. (Figura 3) [21, 22].



**Figura 3: Clasificación de los ácidos biliares con respecto a su hidrofobicidad.**

*Modica, S y col. Nucl Recept Signal. 2010. [21]*

La retención de ácidos biliares hidrofóbicos en condiciones de patologías hepáticas, como por ejemplo en enfermedades colestásicas, participa de manera muy importante en el daño hepático induciendo la apoptosis y la necrosis de los hepatocitos [23]. Así, la retención y acumulación de CDCA y DCA dentro de los hepatocitos durante la colestasis es la principal causa de daño hepático en esta enfermedad. Experimentalmente, los ácidos biliares hidrofóbicos son capaces de producir daño en hepatocitos primarios [24], líneas celulares hepáticas [25] y en el hígado [26], pero los mecanismos implicados en este proceso todavía no están totalmente descritos.

Este daño que se produce en las células parenquimales que ocurre en los primeros estadios del proceso colestásico puede ser el responsable de las respuestas inflamatorias y fibrogénicas de las células no parenquimales (NPC). Además, el daño en los hepatocitos aumenta la expresión de factores de crecimiento, citoquinas, quimioquinas y productos de la peroxidación lipídica, los cuales son capaces de aumentar la respuesta inflamatoria, estimular la fibrogénesis mediante la activación de las HSC o directamente dañar las células adyacentes [27].

Los ácidos biliares son capaces de disgregar las membranas celulares gracias a su acción como detergentes actuando sobre sus componentes lipídicos, además de promover la producción de las especies reactivas del oxígeno (ROS) que son capaces de oxidar lípidos, proteínas y ácidos nucleicos, y eventualmente causar apoptosis en los hepatocitos. Adicionalmente, estos compuestos son capaces de activar las células de Kupffer y generar ROS, lo cual contribuye al daño que se produce en el hígado [20].

#### **1.2.4 Enfermedades colestásicas.**

Colestasis deriva del vocablo griego chole (bilis) y stasis (permanecer detenido) y se refiere a un grupo de enfermedades en las que el flujo biliar se interrumpe por alteraciones en la secreción o limitación del flujo de la bilis hacia el duodeno. Este término fue acuñado por el anatómo-patólogo Hans Pooper en 1956 [28].

La alteración en la secreción biliar puede ser resultado de un defecto funcional en la formación de la bilis en el hepatocito, por una obstrucción en los conductos biliares microscópicos (colestasis intrahepática) o por una obstrucción en los conductos biliares macroscópicos (colestasis extrahepática). La mayoría de las enfermedades colestásicas son intrahepáticas [29, 30].

##### **1.2.4.1 *Enfermedades colestásicas intrahepáticas.***

Las dos enfermedades colestásicas más importantes y con más prevalencia son la cirrosis biliar primaria (CBP) y la colangitis esclerosante primaria (CSP), siendo ambas

enfermedades colestásicas intrahepáticas producidas por una obstrucción en los conductos biliares microscópicos [30].

✓ La cirrosis biliar primaria es una enfermedad crónica progresiva del hígado originada por una paulatina destrucción de los conductos biliares intrahepáticos como consecuencia de un infiltrado inflamatorio crónico, a veces granulomatoso, de los espacios porta situados alrededor de estos conductos biliares intrahepáticos. Aunque puede conducir lentamente a una cirrosis hepática, no todos los pacientes la desarrollan. Su causa es desconocida [31, 32]. La lesión se inicia alrededor de los conductillos biliares intrahepáticos de pequeño y mediano calibre, lo que produce la obstrucción del flujo biliar [31, 32].

✓ La colangitis esclerosante primaria es una enfermedad hepática crónica caracterizada por la presencia en todo el árbol biliar de pequeñas estenosis que alternan con dilataciones. Consiste en una inflamación crónica de los conductos biliares (colangitis) desde los microscópicos que están en el interior del hígado hasta el resto de los grandes conductos que drenan la bilis en el duodeno. Esta inflamación crónica produce una cicatrización con fibrosis de estos conductos que quedan rígidos (esclerosante) y con zonas de obstrucción y dilatación segmentaria [31, 32].

#### **1.2.4.2 Enfermedades colestásicas secundarias o extrahepáticas.**

Dentro de las colestásis extrahepáticas, que producen un bloqueo en el ducto biliar, se encuentran gran cantidad de tumores, así como infecciones por parásitos y otras causas como por ejemplo la pancreatitis crónica, en la que la cabeza del páncreas puede comprimir el conducto biliar [31, 32].

### **1.3 La inflamación durante proceso fibrogénico en el hígado.**

En el caso concreto del hígado, cabe destacar que antes de que se desarrolle el proceso fibrogénico, tiene lugar un proceso inflamatorio con el fin de compensar y resolver el daño que se ha producido. Cuando esta inflamación no puede ser resuelta porque el daño no remite, el proceso inflamatorio desencadena el proceso fibrogénico [33-35].

Las células de Kupffer juegan un papel central en la inflamación hepática. Tal como se ha señalado anteriormente, estas son los macrófagos residentes en el hígado, los cuales se sitúan en el sinusoides hepático y forman aproximadamente el 30% de las células del sinusoides [36]. En respuesta al daño en el hepatocito por los ácidos biliares, las células de Kupffer reconocen estas señales de daño a través de los TLRs, receptores tipo Toll, que forman parte del sistema inmunitario innato. A continuación, éstas células se activan, expresando citoquinas y moléculas de señalización

proinflamatorias como el factor de necrosis tumoral (TNF $\alpha$ ), la interleuquina (IL) 1 $\beta$ , y la IL6 entre otras [37]. Tras su activación, las células de Kupffer también expresan el factor de crecimiento transformante  $\beta$ 1 (TGF $\beta$ 1), el cual activa las HSC, responsables últimas del desencadenamiento del proceso fibrogénico en el hígado [35].

En el proceso inflamatorio previo al desencadenamiento de la fibrosis, además de la activación de los macrófagos residentes, se produce un reclutamiento de macrófagos de médula ósea, los cuales son un factor clave en el desarrollo del proceso inflamatorio crónico y agudo en el hígado [35]. Tradicionalmente, los macrófagos se se clasifican de acuerdo con 3 fenotipos en proinflamatorios (M1), reparadores (M2) e inmunosupresores [38]. Los macrófagos M1 se activan en respuesta al interferón gamma (IFN $\gamma$ ), lipopolisacárido bacteriano (LPS) y TNF $\alpha$ , y son capaces de expresar citoquinas proinflamatorias como TNF $\alpha$ , IL6 e IL1, las cuales están implicadas en la inflamación crónica del hígado. Los macrófagos M2 se activan por las citoquinas IL4, IL10 e IL13, entre otras, y son capaces de producir IL10, TGF $\beta$ , PDGF y EGF, las cuales tienen efectos antiinflamatorios y promueven la cicatrización y reparación del daño producido [38, 39]. Los macrófagos reclutados de médula ósea, presentan un fenotipo distinto de la clasificación M1/M2 siendo capaces de incrementar la expresión de las metaloproteinasas de matriz extracelular (MMP), factores de crecimiento y genes relacionados con la fagocitosis, incluyendo la MMP9 y MMP12, el factor de crecimiento similar a la insulina tipo 1 (IGF1) y la glicoproteína transmembrana NMB (Gpnmb). Estos macrófagos son los responsables de la remodelación del tejido hepático dañado [40].

Además de la acción de las células de Kupffer y de los macrófagos reclutados, en el proceso inflamatorio previo al desencadenamiento del proceso fibrogénico actúan neutrófilos [41] y linfocitos T [42].

#### **1.4 Activación de las HSC y su relación con las enfermedades colestásicas.**

En casos de enfermedades colestásicas que cursan con daño en los hepatocitos, se produce la acumulación de los ácidos biliares seguida de la activación del sistema inmune innato, y la inflamación resultante conduce al desencadenamiento del proceso fibrogénico mediado por la activación de las HSC. Estas células se activan al aumentar la expresión de TGF $\beta$ 1 en el tejido hepático tras el daño mediado por los ácidos biliares, produciéndose la secreción y deposición de la matriz extracelular (ECM) [35]. Las HSC se encuentran en estado quiescente en un hígado sano y se localizan en el espacio de Disse que es un espacio perisinusoidal situado entre una capa de hepatocitos y el sinusoides hepático. Las HSC quiescentes son capaces de almacenar Vitamina A en gotas lipídicas, lo que representa el mayor almacenaje de Vitamina A en

todo el organismo [43]. La activación y diferenciación de las HSC en miofibroblastos está caracterizada por la disminución de este almacenamiento de Vitamina A [44]. Las HSC activadas son la principal fuente de producción de ECM en el proceso fibrogénico y también contribuyen al inicio del proceso inflamatorio, así como a la secreción de citoquinas proinflamatorias [35]. Los principales marcadores de activación de las HSC son el colágeno tipo I (COL1) y la alfa actina del músculo liso ( $\alpha$ SMA), ambos aumentados siempre en procesos colestáticos [45]. Por otro lado, cabe destacar el papel del inhibidor del activador del plasminógeno 1 (PAI1) implicado en la activación del proceso fibrogénico, el cual siempre se encuentra elevado en patologías que cursan con daño hepático como el daño colestático [46].

### **1.5 La regulación de la matriz extracelular por las metaloproteinasas de la matriz extracelular (MMP) y su relación con el proceso fibrogénico.**

Las MMP son las enzimas encargadas de la degradación de la matriz extracelular. Estas enzimas se expresan basalmente en todos los tejidos puesto que controlan la homeostasis de la ECM, manteniendo un equilibrio entre la síntesis de las fibras de colágeno y su degradación. Además de regular la remodelación de la ECM, las MMP están implicadas en la regulación de la respuesta inmune [47-51].

La familia de las MMP está formada por 24 endopeptidasas dependientes de Zinc que son capaces de degradar los componentes de la ECM [52]. Estas MMP se encuentran agrupadas en 5 grupos dependiendo del sustrato sobre el que actúan: colagenasas, gelatinasas, de membrana, estromelisin y matrilisin [53]. Además, tal como se ha indicado anteriormente, las MMP pueden actuar sobre otros sustratos que no sean componentes de la ECM como citoquinas y quimioquinas teniendo una función reguladora sobre la respuesta inmune e inflamatoria [54].

La regulación de la expresión de estas enzimas se produce a nivel transcripcional, a nivel postranscripcional y a nivel proteico [55], siendo los principales reguladores las proteínas TIMP. A día de hoy se conocen por lo menos cuatro tipos diferentes de proteínas TIMP (TIMP 1-4) que son capaces de unirse de manera reversible a las MMP. Las alteraciones en el balance MMP-TIMP se correlacionan con gran cantidad de procesos patológicos que se caracterizan por la disrupción de las membranas basales conduciendo a la invasión tumoral, angiogénesis y cicatrización y reparación de tejidos [52-55].

#### **1.5.1 Las MMP en el hígado sano.**

Las principales proteínas que forman parte de la matriz extracelular son el colágeno I, III, IV y V, la fibronectina y la laminina [56, 57]. La relación de estas proteínas puede

aumentar o disminuir dependiendo del balance entre la síntesis de nuevas proteínas de la ECM y su degradación proteolítica por las MMP. En el hígado humano adulto la reposición de la ECM es muy moderada lo que se correlaciona con una baja expresión de MMP entre las que se encuentran MMP1, MMP2, MMP3, MMP11 y MMP13 [48-51].

### **1.5.2 Las MMP en patologías hepáticas.**

En respuesta a distintos tipos de daño, entre los que se incluye el daño colestásico, el hígado puede sufrir una descompensación en la homeostasis de la ECM. Cuando se produce un daño agudo, los cambios que se producen en la ECM serán transitorios y la arquitectura del hígado completamente restaurada. En un daño crónico, la respuesta inmune persiste y se produce la acumulación de las proteínas de la ECM, siendo esto debido a que las MMP no son capaces de degradar dichos acúmulos proteicos y, de esta manera, progresivamente el parénquima hepático comienza a ser reemplazado por cicatrices de tejido fibrótico [47, 58].

Entre las MMP más importantes que se expresan en el proceso fibrogénico se encuentra la MMP9, capaz de liberar el TGF $\beta$ 1 de su reservorio en la ECM y activarlo [59-61]. Además, la MMP9 es capaz de promover la apoptosis de las HSC en presencia de los bajos niveles de TIMP1 en el proceso fibrogénico [60]. Por otra parte, se ha descrito que la MMP2 participa en la resolución del proceso fibrogénico inhibiendo la expresión de colágeno tipo 1 en vez de aumentar su degradación [62, 63].

En lo referente a los inhibidores de las MMP se ha demostrado que tanto TIMP1 como TIMP2 se encuentran sobreexpresados en hígados fibróticos de ratón después del tratamiento con tetracloruro de carbono (CCl<sub>4</sub>) o de una ligadura del ducto biliar (BDL), siendo ambos modelos experimentales preclínicos de fibrosis hepática [64]. Así, la sobreexpresión de TIMP1 y TIMP2 conduce a una excesiva acumulación de componentes de la ECM puesto impiden que las MMP ejecuten su función principal [65].

### **1.6 Papel de los sustratos del receptor de la insulina (IRS) como mediadores clave de la ruta de señalización de la insulina/factor de crecimiento similar a la insulina 1 (IGF1).**

Los receptores de insulina (IR) e IGF1 (IGF1R) pertenecen a la superfamilia de receptores con actividad tirosina quinasa [86, 87]. Tras la unión de sus respectivos ligandos, la actividad enzimática intrínseca induce la fosforilación de unas proteínas conocidas como “embarcadero” ya que son capaces de interactuar con múltiples proteínas esenciales en la propagación de la cascada de señalización [66] de manera

que constituyen una herramienta de integración para generar una respuesta celular coordinada. Así, la mayor parte de las vías de señalización intracelular mediadas por ambos receptores se inician alrededor de complejos multiproteicos que están unidos a los residuos fosfotirosina en las proteínas embarcadero. Entre éstas se incluyen los sustratos del receptor de la insulina (IRS), así como otras moléculas como SHC, SHB2, GAB1/2, y CBL, entre otros [67-73]. Aunque todos los sustratos del IR/IGF1R participan en la cascada de señalización, las proteínas IRS son los sustratos clave que median el crecimiento somático del organismo y el metabolismo de los carbohidratos y lípidos [74].

Se han identificado hasta un total de 11 proteínas IRS. En humanos y ratones existen 3 proteínas IRS fundamentales; IRS1 e IRS2 que se expresan en todas las células del organismo, y el IRS4 que se expresa en timo, cerebro, riñón y células  $\beta$  pancreáticas [75]. En roedores también se expresa el IRS3 aunque se restringe al tejido adiposo y su función es similar a la del IRS1 [76].

Todas las proteínas IRS se caracterizan por contener un dominio con homología a pleckstrina (dominio PH) y otro dominio de unión a residuos fosfotirosina (dominio PTB), ambos dominios localizados en extremo amino terminal (N terminal) (Figura 6) y que proporcionan a los IRS una gran afinidad por el IR/GF1R activo [77, 78]. En la región central y en el extremo carboxilo terminal (C terminal) los IRS contienen alrededor de 20 residuos tirosina que se encuentran en una secuencia consenso YMXM y son susceptibles de ser fosforilados por la actividad quinasa del IR/IGF1R. Así, tras la activación del IR/IGF1R tiene lugar la fosforilación en tirosina de dichos residuos de manera que estos dominios fosfotirosina se unirán a proteínas intracelulares que contienen en su secuencia dominios de homología SH2 (dominios de homología al protooncogén Src) [79].

### 1.6.1 El IRS1

El IRS1 fue el primer miembro de la familia en identificarse en células de hepatoma de rata en el año 1985 y en un principio denominó pp185 [80], pero no fue hasta el año 1991 cuando se clonó el gen *Irs1* de rata [81]. Dentro de la estructura del ADNc del gen *Irs1* cabe destacar que la lectura comienza en una secuencia consenso tipo Kozac en el nucleótido 589 y termina en el primer codón de parada en el nucleótido 4293. Este gen, además, presenta una amplia región 5' no codificante. Dentro del marco de lectura se encuentran 55 residuos aminoacídicos serina y treonina susceptibles de fosforilación, además de los residuos tirosina mencionados anteriormente. En la especie humana el gen *IRS1* se localiza en el cromosoma 2q36-37 y comprende un único exón [82]. En roedores el gen *Irs1* también carece de secuencias intrónicas [83].



La proteína IRS1 tiene un peso molecular de 131 KDa pero debido a la cantidad de sitios potenciales de fosforilación y a su compleja estructura secundaria su migración electroforética se encuentra en torno a los 180 KDa en geles de SDS-PAGE. En su estructura, en el extremo N terminal se encuentra el dominio PH [84] por el cual se une a proteínas acidificadas [85] y a los fosfoinosítidos fosfatidilinositol (PI) 3,4 difosfato (PI(3,4)P<sub>2</sub>) y PI 3,4,5 trifosfato (PI(3,4,5)P<sub>3</sub>) [86], todos ellos localizados en la membrana plasmática. A continuación, se encuentra el dominio PTB que comprende los aminoácidos 144-316. Este dominio PBT tiene gran homología con el de otras proteínas embarcadero como SHC e IRS2. Mediante este dominio, el IRS1 se une directamente a la tirosina 960 del IR proporcionando una unión más fuerte de la que se consigue sólo con el dominio PH [87].

Por último, en el extremo C terminal, el IRS1 contiene al menos 21 residuos tirosina susceptibles de fosforilación por la actividad tirosina quinasa del IR/IGF1R activado. Los sitios de fosforilación cumplen dos funciones principales, por una parte son el sustrato de la acción catalítica del IR y por otra, tal como se ha mencionado, son reconocidos por los dominios SH2 de proteínas que propagan la señal de la insulina [88].

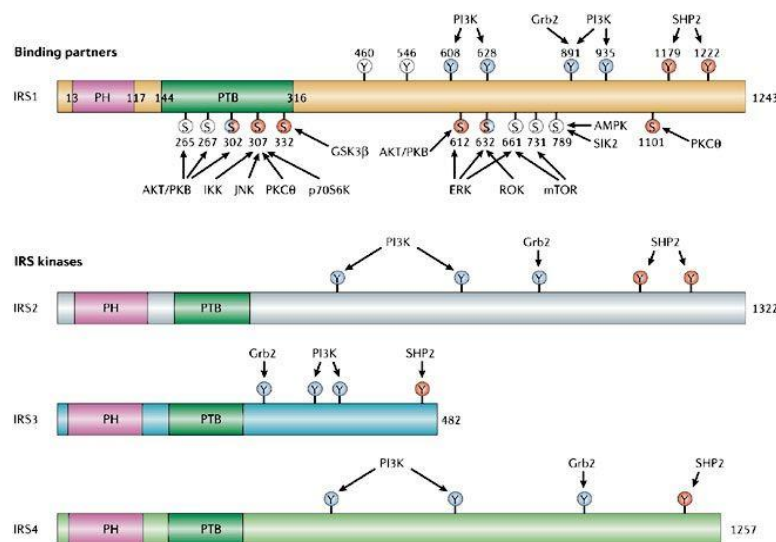
### 1.6.2 El IRS2.

El IRS2 fue el segundo sustrato del IR/IGF1R en ser identificado en el año 1995 [89, 90]. Al principio se le consideró un sustrato del receptor de la citoquina IL4 [91]. Sin embargo, se encontró que el IRS2 era la proteína embarcadero que mediaba la señalización de la insulina en el hígado y en el músculo esquelético de los ratones deficientes en el gen *Irs1* y se confirmó su función fisiológica en la acción de la insulina [89, 90].

El gen *IRS2* en la especie humana está organizado en dos exones y un intrón. El primer exón, con un tamaño de 4,5 kb, contiene la secuencia de la región 5' no traducida y codifica para toda la proteína excepto para los dos últimos nucleótidos. A continuación se sitúa el intrón con un tamaño de 4,2 kb y finalmente se encuentra el último exón que codifica para los dos últimos nucleótidos de la proteína y contiene la secuencia 3' no traducida [92]. En humanos el gen *IRS2* se encuentra en el cromosoma 13 y en ratones el gen del *Irs2* se localiza en el cromosoma 8 y tiene la misma organización que el gen humano [93]. El clonaje del ADNc aportó muchos datos relevantes sobre la estructura de la proteína IRS2 [94]. En ratón tiene un peso molecular de 145 kDa y su estructura presenta una gran homología con el IRS1 (Figura 4). El dominio PH del IRS2 se encuentra entre los aminoácidos 30-159 y el dominio PTB se sitúa entre los aminoácidos 191-350. Estos dominios presentan una

gran homología con los dominios correspondientes del IRS1 (69% y 75% respectivamente). Además, el IRS2 presenta un dominio exclusivo denominado KRLB que se une al dominio regulador del IR [95]. En la región C terminal el IRS2 también contiene varios residuos de tirosina susceptibles de fosforilación dentro de las secuencias aminoacídicas conservadas de la familia de los IRSs. Entre los residuos de tirosina más relevantes se encuentran la Y<sup>649</sup>MPM e Y<sup>969</sup>MNL que se localizan en secuencias consenso de unión a la subunidad p85 de la fosfatidilinositol 3 quinasa (PI3K). Por otro lado, la tirosina Y<sup>911</sup>INI se encuentra en una secuencia de unión a Grb-2 y las tirosinas Y<sup>1242</sup>IAI e Y<sup>1303</sup>ASI se encuentran en unas secuencias de unión a otras proteínas con dominios SH2 [93, 96, 97].

La estructura del IRS2 contiene también varios residuos de aminoácidos serina o treonina que pueden fosforilados por diversas quinasas intracelulares y que constituyen un mecanismo de modulación negativa de la función del IRS2 [98]. Paradójicamente, para que la fosforilación del IRS2 por el IR en residuos de tirosina sea óptima, el IRS2 debe tener un estado basal mínimo de fosforilación en residuos serina y treonina [99]. Por tanto, este balance en la fosforilaciones del IRS2 es considerado como una regulación eficaz de la señalización de la insulina/IGF1 [100].



**Figura 4: Estructura de los sustratos del receptor de la insulina.**

**Taniguchi, C.M y col. Nat Rev Mol Cell Biol. 2006. [79]**

### 1.6.3 La ruta de la señalización de la insulina/IGF1 en el hígado.

Tras la fosforilación del IRS1 e IRS2 mayoritariamente por parte del IR, divergen dos vías de señalización fundamentales que median la señalización de la insulina en el hígado: la vía de la PI3K-AKT, la cual es responsable de la mayor parte de las acciones metabólicas de la insulina, y la vía de las quinasas activadas por mitógenos

(MAPK), a través de la cual se pueden expresar diversos genes y además coopera con la vía PI3K para controlar el crecimiento y la diferenciación celular [101].

#### **1.6.3.1 La señalización de insulina vía PI3K/AKT.**

La principal vía de señalización que une a los IRS con las acciones metabólicas de la insulina es la vía de señalización mediada por la PI3K/AKT (también denominada PKB). La PI3K contiene una subunidad reguladora y una subunidad catalítica. Dentro de la subunidad catalítica existen hasta 3 isoformas distintas (p110 $\alpha$ , p110 $\beta$ , p110 $\gamma$ ) y dentro de la subunidad reguladora existen hasta 5 isoformas (p85 $\alpha$ , p55 $\alpha$ , p50 $\alpha$ , p85 $\beta$  y p55 $\gamma$ ). Por tanto, la combinación entre las distintas isoformas de subunidades reguladoras y subunidades catalíticas dará lugar a los diferentes heterodímeros de la PI3K [79, 102]. El reclutamiento y la activación de la PI3K depende de la unión de los dominios SH2 de la subunidad reguladora a las tirosinas fosforiladas presentes en los IRSs tras la activación del IR por el efecto de la insulina [103, 104]. Esta unión provoca la activación de la subunidad catalítica, la cual es capaz de fosforilar al PI (4,5) P<sub>2</sub> que se encuentra en la membrana plasmática para generar el segundo mensajero lipídico PI (3,4,5) P<sub>3</sub> también denominado PIP<sub>3</sub>. Además, otras proteínas con dominios SH2 localizadas en las inmediaciones del PIP<sub>3</sub> pueden unirse al mismo y propagar la cascada de señalización. Dentro de todas éstas la más relevante para regular las acciones insulínicas es la proteína quinasa dependiente de fosfoinosítidos 1 (PDK1) responsable de la activación de la proteína quinasa AKT/PKB y de isoformas atípicas de la familia de la proteína quinasa C. Así, la PDK1 fosforila a AKT/PKB en el residuo treonina 308 [105] y a PKC $\zeta$  en el residuo treonina 410 [106] aumentando la actividad de estas quinasas. Sin embargo, para la activación completa de AKT/PKB es necesaria la fosforilación en el residuo serina 473 por el complejo mTORC2 (Figura 7) [79].

AKT/PKB media la mayor parte de los efectos metabólicos de la insulina a través de la fosforilación de numerosos sustratos, incluyendo otras quinasas, proteínas de señalización y factores de transcripción [79]. Las dos funciones principales de esta ruta de señalización en el hígado son la síntesis de glucógeno y la gluconeogénesis.

✓ La síntesis de glucógeno es un proceso que se realiza en el hígado, y está mediado por la GSK3 $\beta$ . Cuando aumenta la ingesta, la señalización de la insulina se activa y AKT/PKB fosforila a GSK3 $\beta$  en los residuos serina 9 y 21 siendo estas fosforilaciones inactivantes. En consecuencia, la glucógeno sintasa pierda la regulación negativa por parte de GSK3 y se activa la síntesis de glucógeno [107].

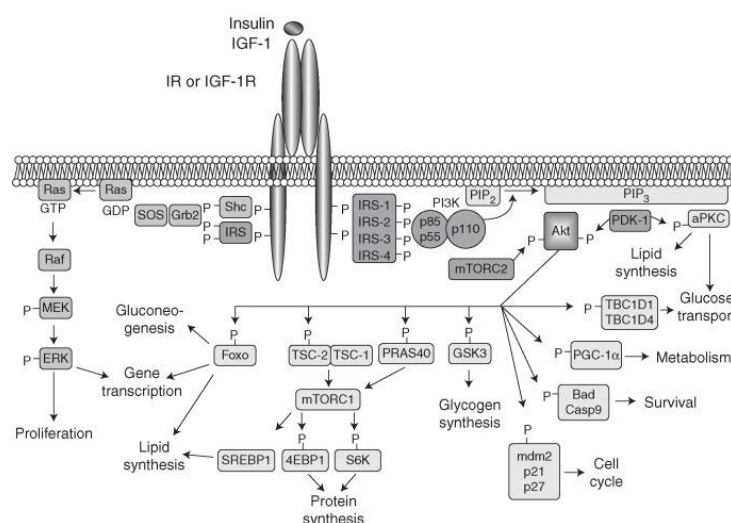
✓ La gluconeogénesis se define como la síntesis *de novo* de glucosa. La ruta AKT/PKB regula la expresión de enzimas gluconeogénicas controlando la actividad de

FOXO1 en el hígado. La familia de las proteínas FOX está compuesta por más de 100 factores de transcripción y muchos de ellos son cruciales en la acción de la insulina [108]. FOXO1 en el hígado es un factor de transcripción capaz de activar la expresión de genes gluconeogénicos [109]. La insulina es capaz de revertir estos efectos a través de AKT/PKB la cual fosforila a FOXO1 en el residuo serina 256 lo que resulta en la exclusión nuclear de FOXO1 y, por tanto, en la inhibición de genes clave de la gluconeogénesis [108].

Aunque la señalización de la insulina en el hígado está mediada por IRS1 y por IRS2, como se indicará más adelante, los estudios en ratones genéticamente modificados para ambos IRS revelaron el papel crucial del IRS2 en este tejido.

### 1.6.3.2 La señalización de insulina vía Ras/MAPK.

Esta cascada se inicia tras la unión de Grb-2, una proteína de localización citosólica que contiene un dominio SH2 que le permite unirse a IRS1, IRS2 y SHC, y dos dominios SH3 a través de los cuales se une a la proteína intercambiadora de nucleótidos de guanina, SoS. De esta manera, Grb-2 constituye el enlace entre los receptores tirosina quinasa y la cascada de las MAPK [110]. SoS a su vez activa a la proteína Ras mediante el recambio de GTP por GDP [111]. La activación de Ras induce la traslocación a la membrana y la activación de la serina/treonina quinasa Raf-1, la cual es una MAPKKK que actúa fosforilando a las MAPK quinasas MEK1 y MEK2 [112-114]. Una vez activadas, las MEK fosforilan y activan a la p42/p44 MAPK (también denominadas ERK1/2) en un residuo treonina 183 y un residuo tirosina 185 [115]. En su estado activo las p42/p44 MAPK se traslocan al núcleo donde fosforilan una gran variedad de factores de transcripción que regulan la expresión génica y la proliferación celular (Figura 5) [116-119].



**Figura 5: Ruta de señalización de la insulina/IGF1.**

**Boucher, J y col. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2014. [119]**

## 1.7 Modelos animales deficientes en IRS1 e IRS2.

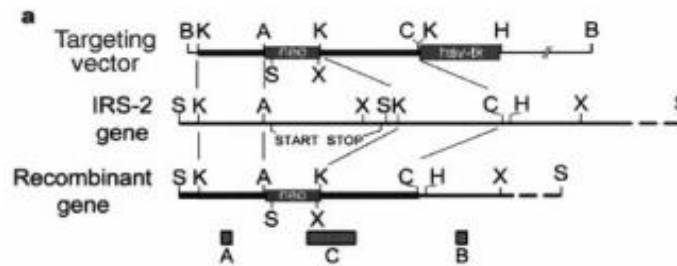
La oportunidad de estudiar el papel específico del IRS1 e IRS2 en las acciones mediadas por la insulina y el IGF1 surgió con la generación de los ratones deficientes para cada gen.

### 1.7.1 El ratón deficiente en IRS1 (IRS1KO).

Los ratones IRS1KO se generaron en paralelo por dos grupos de investigación independientes que obtuvieron resultados similares [120, 121]. Dichos ratones son viables aunque presenta un retraso en el crecimiento del 40-50%. En respecto a su estado metabólico, presentan normoglucemia en ayuno, hiperinsulinemia y una resistencia moderada a la acción de la insulina, del IGF1 y del IGF2, características típicas del síndrome metabólico, ya que además cursan con hipertrigliceridemia, hipertensión y una menor capacidad de relajación del endotelio vascular. Otro defecto observado en estos ratones es una osteopenia severa [122]. En estudios posteriores, se descubrió que los niveles de insulina requeridos por el ratón IRS1KO se mantenían gracias al mayor tamaño de sus islotes pancreáticos en un proceso que se conoce como  $\beta$  compensación y que está mediado por el IGF1 [123]. En el hígado, la activación de la PI3K en los ratones IRS1KO era similar a la de los controles de genotipo salvaje ya que esta compensación era debida a la presencia del IRS2 [124, 125]. Además, la señalización de insulina en el músculo esquelético del ratón IRS1KO estaba afectada de manera negativa en cuanto a la síntesis de proteínas. Sin embargo, en otras funciones del músculo esquelético como el transporte de glucosa existen datos contradictorios de disminución o de compensación por parte del IRS2 [124-126].

### 1.7.2 El ratón deficiente en IRS2 (IRS2KO).

El ratón deficiente en el gen *Irs2* se generó en el laboratorio de M. White y se publicó en 1998 [127]. Para ello, se inactivó dicho gen por recombinación homóloga siguiendo el esquema de la Figura 6. Una vez establecida la colonia, se mantuvo en un fondo genético mixto de C57L6 x 129sv.



**Figura 6: Vector recombinante para el silenciamiento de IRS2.**

**Whiters DJ y col. Nature, 1998. [127]**

La pérdida del gen *Irs2*, a diferencia del *Irs1*, tiene un impacto menor en el crecimiento de los ratones puesto que solamente se observa un retraso del 10%. Sin embargo, otros órganos como los ovarios en las hembras y el cerebro en los machos presentan un tamaño más pequeño en comparación con los ratones de genotipo salvaje o IRS1KO [128, 129]. Los estudios metabólicos han revelado que los ratones IRS2KO tienen moderadamente alterada la homeostasis glucídica en la juventud que se convierte en severa con la madurez del animal. A las 6 semanas, los machos IRS2KO presentan resistencia a la insulina y una hiperinsulinemia más acusada que en las hembras. Este cuadro metabólico progresa y conduce a una diabetes severa con la muerte de los animales macho a las 10-14 semanas de edad. A nivel tisular estos ratones presentaban una resistencia a la insulina en el hígado debido a la falta de los mecanismos compensatorios por parte del IRS1 sobre la actividad de la PI3K que es necesaria para inhibir la gluconeogénesis e inducir la síntesis de glucógeno en respuesta a la insulina [130, 131]. Así mismo, nuestro grupo de investigación demostró que la falta de IRS2 aumentaba el grado de apoptosis en los hepatocitos ante la retirada de suero [132]. Por otro lado, en relación con el músculo esquelético, mientras que un estudio ha señalado que la deficiencia en el gen *Irs2* en este tejido se compensaba por la señalización vía IRS1 [133], resultados de nuestro laboratorio demostraron una resistencia a la insulina a nivel muscular [134]. Por otra parte, la resistencia a la insulina hepática y/o muscular de los ratones IRS2KO no puede ser compensada por una mayor producción de esta hormona por parte de los islotes pancreáticos como ocurre en el ratón IRS1KO ya que la masa de células  $\beta$  pancreáticas es menor que en los ratones de fenotipo salvaje o IRS1KO [135]. Esto es debido al papel esencial del IRS2 en la señalización del IGF1 que controla la proliferación de las células beta pancreáticas [74, 136].

Posteriormente se dilucidó a nivel molecular la causa de la falta de compensación por parte del IRS1 sobre la señalización de la insulina en el hígado de los ratones IRS2KO. Estos estudios revelaron un papel clave de la proteína tirosina fosfatasa 1B (PTP1B), proteína fundamental que constituye el primer punto de regulación negativa

de la vía de señalización de la insulina/IGF1. La PTP1B defosforila al IR y al IGF1R activos deteniendo la cascada de señalización de ambas moléculas [137]. Curiosamente, la PTP1B se encontraba aumentada en los hígados de los ratones IRS2KO debido a una modulación transcripcional positiva debida a la hiperglucemia [138]. De esta manera, al generar el ratón deficiente en IRS2 y PTP1B se restauró la señalización de la insulina en el hígado mediada por la ruta alternativa IRS1/PI3K/AKT/FOXO1, así como los defectos en la proliferación de las células  $\beta$  pancreáticas. Además, el tratamiento de los animales IRS2KO con resveratrol, un potente antioxidante, mostró los mismos resultados que los obtenidos en el ratón doble nulo en relación con los efectos en el hígado puesto que dicho tratamiento disminuía los niveles y actividad de la PTP1B en este tejido [134, 139].

El análisis metabólico y reproductivo de las hembras IRS2KO fue llevado a cabo por Burks y col. [128]. Este estudio reveló que las hembras IRS2KO eran estériles debido en parte al tamaño reducido de los ovarios, lo que producía un menor número de folículos y un córtex mucho más delgado en relación a las hembras de genotipo salvaje. Las hembras IRS2KO también presentaban anovulación y una reducción en el estroma de los ovarios unido a una pérdida casi total del cuerpo lúteo. Además de todas estas alteraciones, los niveles de hormona luteinizante eran muy bajos lo que sugería defectos en la producción o secreción de esta hormona que controla la maduración de los folículos, la ovulación, la iniciación del cuerpo lúteo y la secreción de progesterona. Por tanto, este trabajo aportaba datos muy novedosos en cuanto a la relación de la regulación endocrina de los ovarios y las proteínas IRS. En este mismo estudio, a nivel metabólico se encontró que las hembras IRS2KO presentaban un fenotipo mucho más moderado que los machos ya que no desarrollaban una severa diabetes. Sin embargo, hembras IRS2KO ingerían un 30% más de pienso que las hembras controles que se reflejaba en un 20% de aumento en el peso corporal y en la cantidad tejido adiposo. La medida de los niveles circulantes de leptina reveló niveles significativamente aumentados lo que sugería una resistencia a la leptina que se manifestaba a nivel molecular por una atenuada la señalización de la leptina en el hipotálamo mediada por el factor de transcripción STAT3.

### **1.7.3 Fenotipo de los ratones deficientes en IRS1 o IRS2 de manera específica en el hígado (L-IRS1KO o L-IRS2KO).**

En condiciones fisiológicas la vía de señalización de la insulina en el hígado conduce a la supresión de la gluconeogénesis y promueve la lipogénesis. Los ratones con deficiencia de IRS1 y/o IRS2 específicos de hígado (L-IRS1KO e L-IRS2KO, respectivamente), generados en 2008 por Dong y col [140], y en el año 2000 por Kubota y col [135], respectivamente, han resultado de utilidad para investigar a nivel

molecular la “resistencia selectiva” a la insulina que ocurre en el tejido hepático durante la T2DM que viene determinada por la supresión de la gluconeogénesis unida, paradójicamente, a una exacerbada lipogénesis. Tras alimentar a dichos ratones con una dieta rica en grasa se encontró que los ratones L-IRS2KO desarrollaban una esteatosis hepática de mayor grado que los correspondientes controles y los ratones L-IRS1KO, lo que revelaba una resistencia selectiva a la insulina en ausencia de IRS2 a nivel hepático. Estos resultados confirmaban estudios pioneros de Brown and Goldstein donde describían la “resistencia selectiva” a la insulina en situaciones de baja expresión de IRS2 y niveles fisiológicos de IRS1 [141].

Un estudio posterior ha revelado también diferencias en la señalización de la insulina vía IRS1 o IRS2 en dos regiones hepáticas; la zona periportal (PP) donde se produce la gluconeogénesis, y la zona perivascular (PV) donde se lleva a cabo la lipogénesis. Este trabajo mostraba que en los animales de genotipo salvaje sometidos a dieta grasa la expresión de IRS2 estaba disminuida significativamente en ambas zonas, mientras que la expresión de IRS1 permanecía intacta y, de hecho, era dos veces superior en la zona PV que en la zona PP. Esto concurría con una señalización de la insulina defectuosa en la zona PP, debida a la hiperinsulinemia que genera la dieta grasa y, en paralelo, con una señalización insulínica exacerbada en la zona PV, lo que se asociaba con una mayor esteatosis hepática [142]. Además, en los ratones L-IRS2KO sometidos a una dieta grasa se observó una mayor deficiencia en la señalización de la insulina en la zona PP, a pesar de que la expresión de IRS1 permanecía intacta, lo que resultaba en un fallo en la supresión de la gluconeogénesis que conducía a hiperglicemia. Sin embargo, en la zona PV de estos ratones L-IRS2KO, donde la expresión del IRS1 es predominante, la señalización de la insulina se encontraba exacerbada lo que resultaba en un acelerado desarrollo de esteatosis hepática. Por otro lado, se vio que al delecionar el gen *Irs1* específicamente en el hígado y al someter a los ratones a una dieta rica en grasa que como se ha señalado causa una bajada de IRS2 debida a la hiperinsulinemia, se produce un fallo en la vía de señalización de la insulina en ambas zonas PP y PV, lo que conllevaba a una hiperglicemia y una supresión del desarrollo de esteatosis hepática. Todos estos datos sugieren que la distribución diferencial del IRS1 e IRS2 y la alteración de su expresión en las distintas zonas del hígado juega un papel muy importante en el desarrollo de la “resistencia selectiva a la insulina” en estados de obesidad y DMT2 [142].

Finalmente cabe señalar que la metformina es un potente agente hipoglicémico que ha sido usado durante décadas para tratar la DMT2 [143]. Un estudio llevado a cabo por Xu y col [144] ha analizado el efecto de este fármaco en modelos animales de



resistencia a la insulina asociada a esteatohepatitis no alcohólica (NASH) y cirrosis y su relación con el IRS2. Estos autores demostraron que la metformina disminuía el daño hepático en ratas con NASH y cirrosis y también atenuaba el estrés oxidativo hepático además de disminuir la intolerancia a la glucosa y la resistencia a la insulina. A nivel molecular, la metformina aumentaba la expresión hepática del IR además de aumentar su fosforilación, y la fosforilación y activación del IRS2 y de AKT, lo que resalta la importancia del IRS2 como una posible diana terapéutica en enfermedades hepáticas asociadas a trastornos metabólicos.

## **2. OBJETIVOS**

Considerando por un lado que el daño colestásico en el hígado está asociado al desarrollo del proceso fibrótico y, por otro, que el IRS2 es un modulador de las rutas del metabolismo glucídico y lipídico en este tejido, el principal objetivo de esta Tesis Doctoral ha sido el dilucidar el impacto de la deficiencia del gen *Irs2* en ratón en la aparición y desarrollo del proceso fibrótico asociado al daño biliar.

Hemos planteado dos objetivos específicos:

1. Caracterización del proceso fibrótico asociado a colestasis biliar en un modelo murino deficiente en el gen *Irs2* e identificación de las dianas clave que resultan afectadas en este modelo.
2. Estudio mecanístico de la ruta de señalización que conlleva a la activación de las células estelares hepáticas inducida por el IGF1. Evaluación del papel del IRS2 en este proceso celular.

### **3. MATERIALES Y MÉTODOS**

### 3.1 Colonia de ratones deficientes en el gen *Irs2*

La colonia de ratones modificados genéticamente, en el fondo genético mixto C57/Bl6 x 129sv se encuentra establecida en el animalario del IIBm Alberto Sols. Originalmente los animales se adquirieron a “The Jackson Laboratory” y se ha mantenido según las condiciones de estabulación descritas en González Rodríguez y col. [139]. La experimentación animal de esta Tesis ha sido aprobada por los Comités de Bioética del IIBm Alberto Sols y del CSIC, así como por la Comunidad de Madrid (Consejería de Medio Ambiente, Administración Local y Ordenación del Territorio).

#### 3.1.1 Genotipado de la colonia de ratones deficientes en el gen *Irs2*.

El genotipado de los ratones se ha realizado mediante la técnica de la reacción de la polimerasa en cadena (PCR) a partir de una pequeña muestra tomada de la oreja la cual se extrae en el marcaje de los mismos.

##### ✓ *Aislamiento del ADN genómico.*

La muestra de oreja se deposita en un tubo eppendorf.

- Se añaden 300 µl de NaOH 25 mM y se calienta a 95°C durante 10 minutos.
- Se deja atemperar durante 10 minutos.
- Se añaden 150 µl de Tris HCl 1M pH 8 para neutralizar el pH.
- Se centrifuga a 12000 rpm durante 10 minutos.

En el sobrenadante se encuentra el DNA genómico extraído.

##### ✓ *Análisis mediante PCR.*

La reacción PCR es una reacción enzimática que amplifica millones de veces una secuencia específica de ADN durante varios ciclos repetidos en los que la secuencia diana es copiada fielmente. La secuencia diana es flanqueada por dos oligonucleótidos denominados cebadores (del inglés “primers”) que hibridan con cada una de las cadenas complementarias.

Protocolo de hibridación:

- Desnaturalización Inicial: Tª 94°C, 1 minuto.
- $\left( \begin{array}{l} \text{Tª 94°C, 30 segundos.} \\ \text{Tª 55°C, 30 segundos.} \\ \text{Tª 72°C, 1 min 30 segundos.} \end{array} \right) \times 30 \text{ ciclos.}$
- Elongación Final: Tª 72°C, 2 minutos.

Composición de la mezcla de reacción (Volumen final 20 µl)

2 µl muestra de ADN

Oligo Upper 0,5 µl

Oligo Lower 0,5 µl

Oligo Neo 1 µl

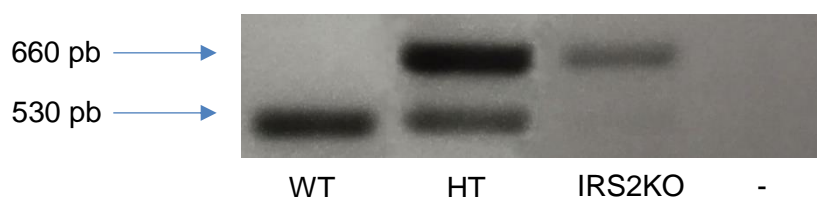
Taq Polimerasa 6 µl

Agua MiliQ 10 µl

Todos los oligonucleótidos fueron adquiridos de Sigma-Aldrich® y la Taq Polimerasa de Biotools (Ref. 4749).

<b>Oligonucleótido</b>	<b>Secuencia 5' → 3'</b>
IRS2 Upper	CTTGGCTACCATGTTGTTATTGTC
IRS2 Lower	AGCTCTGGAGGTTTACTTTCCT
IRS2 Neo	GCTATCAGGACATAGCGTTGG

**Tabla 1: Lista de oligonucleótidos y secuencias para el genotipado de la colonia de ratones deficientes en *Irs2*.**



**Figura 7: Genotipado de ratones de genotipo salvaje (WT), heterocigoto para el gen *Irs2* (HT) y deficiente en *Irs2* (IRS2KO).**

### 3.1.2 Experimentación In vivo.

#### ✓ *Ligadura del Ducto Biliar Común (BDL).*

Tal como se indica en la introducción, en la mayoría de los vertebrados el hígado es el encargado de producir la bilis que es necesaria para emulsionar las grasas absorbidas y permitir la digestión de lípidos en el intestino delgado, así como para la excreción de la bilirrubina y otros productos metabólicos. En el hígado, la obstrucción experimental del sistema biliar (ligadura del ducto biliar, *BDL del inglés bile duct ligation*) inicia una compleja cascada de eventos fisiopatológicos que conduce a la colestasis e inflamación y que terminará con el desarrollo de fibrosis hepática que puede detectarse a los 28 días de la operación. Por tanto, la ligadura quirúrgica del ducto biliar común se ha convertido en el modelo más utilizado para estudiar los eventos moleculares y celulares que subyacen a la lesión colestásica obstructiva que se produce en los roedores sometidos a este protocolo quirúrgico. La tasa de mortalidad puede ser alta debido a complicaciones infecciosas o inexactitudes técnicas.

Procedimiento:

- *Anestesia del animal:* Se emplea anestesia inhalatoria (isoflurano) seguido de analgesia (Buprex®).
- *Preparación del ratón:* Se rasura y desinfecta el abdomen del animal.

- Se realiza una incisión longitudinal en el abdomen de aproximadamente de 2 cm siguiendo la línea alba para acceder a los órganos abdominales.
- Se coloca un tubo de 5-10 mm de diámetro detrás del dorso del animal que lo obliga a arquearse para conseguir un mejor acceso al ducto biliar.

*Método de la ligadura del ducto biliar:*

- Se aísla el ducto biliar por apertura de la membrana que lo mantiene en contacto con los vasos.
  - Se coloca un estilete acanalado debajo del ducto y se realizan dos ligaduras triples con seda trenzada 6/0 no reabsorbible con una separación de 5 mm entre ellas.
  - Se corta el ducto biliar entre las dos ligaduras.
  - Se realiza la sutura con seda trenzada 4/0 en la capa muscular y sucesivamente se sutura la capa cutánea.
  - Se aplica tintura de yodo en la zona de la cirugía y el animal se coloca sobre una manta eléctrica a 37°C con el objetivo de que se mantenga la temperatura corporal.
- ✓ *Análisis sérico de Bilirrubina total (BT), Fosfatasa Alcalina (FA) y de la glutámico oxalacetático transaminasa.*

El análisis sérico de estas 3 enzimas nos revela el grado de lesión hepática de los ratones.

Para la medida de la concentración de estas enzimas:

- Se extrae la sangre del ratón en el momento del sacrificio.
- Se centrifuga la sangre a 12000 rpm durante 10 minutos y se recoge el suero.
- Se realiza una dilución 1/3 de este suero y se aplica las tiras reactivas correspondientes insertándose inmediatamente en el aparato de medida Reflotron® (Roche Diagnostics). BT (Ref. 10905321203), FA (Ref. 11622773204), GOT (Ref. 10745120).

### **3.2 Histología de las muestras de tejido hepático**

Las muestras de hígado se introducen directamente en paraformaldehído al 4% (PFA 4%), para proceder a su fijación. A continuación, las muestras se introducen en un procesador de tejidos para su deshidratación aumentando el endurecimiento de las muestras para facilitar los cortes de tejido. El siguiente paso es la inclusión de los tejidos en parafina y la confección de los bloques. Para la realización de estos bloques se utilizan estaciones de inclusión, que constan de un dispensador de parafina líquida, una placa caliente para la orientación de las muestras de tejido y una placa fría que

permite la solidificación del bloque. Una vez formados los bloques, se cortan en un micrótopo de rotación en secciones de 5 µm y se colocan sobre un portaobjetos.

Previamente a la realización de cualquier tinción en tejido hepático se procede a la desparafinación e hidratación del tejido. Para ello, se introducen los portaobjetos con las muestras hepáticas en xileno, derivado dimetilado del benceno, lo cual producirá la desparafinación del tejido, este proceso se realiza en campana de extractora de gases puesto que el xileno es un solvente muy tóxico. Posteriormente a la desparafinación se procede a la hidratación de las muestras. Para ello, se introducen los portaobjetos en un gradiente de alcoholes secuencial, pasando por etanol al 96%, etanol al 80%, etanol al 70% y finalmente etanol al 50%, permaneciendo las muestras durante 5 minutos en cada alcohol.

### 3.2.1 Tinciones histológicas.

#### ✓ *Tinción con Hematoxilina-Eosina.*

La tinción con hematoxilina se basa en que al ser catiónica o básica tiñe estructuras ácidas (basófilas) en tonos azul y púrpura como por ejemplo los núcleos celulares. La tinción con eosina por su naturaleza aniónica o ácida tiñe componentes básicos (acidófilos) en tonos de color rosa, como por ejemplo el citoplasma. Todas las tinciones han sido realizadas con hematoxilina de Harris y eosina alcohólica.

#### ✓ *Tinción con Tricrómico de Masson.*

Esta tinción se utiliza para evidenciar fibras de colágeno en el tejido conjuntivo cuya función fundamental es el soporte mecánico. El tricrómico de Masson es una tinción diferencial y policrómica. En todos los métodos tricrómicos se utilizan 3 colorantes:

1. Un **colorante nuclear**, normalmente una laca de hematoxilina.
2. Un **colorante citoplásmico**: orange G, ponceau de xilidina, escarlata de Biebrich, azofloxina, etc.
3. Un **colorante del conjuntivo** (para las fibras de colágeno) que suele ser un derivado del anillo de trifenilmetano.

Después de la desparafinación e hidratación de las muestras, se procede a la tinción con el Kit de Bio-Optica (Ref. 04-010802) siguiendo el protocolo que se indica en la ficha técnica.

Después de la hidratación de las muestras éstas se mantienen en agua destilada.



A continuación, se mezclan 6 gotas de solución A (Hematoxilina férrica de Weigert's) con 6 gotas de solución B (Hematoxilina férrica de Weigert's) y se cubre la muestra con esta solución.

Sin lavar, se escurren las muestras y se añaden 10 gotas del reactivo C (solución alcohólica de ácido pícrico). Se lavan rápidamente y seguidamente se depositan sobre la muestra 10 gotas del reactivo D (Ponceau – fucsina ácida de Mallory) durante 4 minutos.

Se lavan las muestras con agua destilada y se añaden 10 gotas del reactivo E (ácido fosfomolibdico) durante 10 minutos para finalmente escurrir los portaobjetos y depositar sobre la muestra 10 gotas del reactivo F (azul de anilina) durante 5 minutos.

✓ *Tinción con Rojo Sirio*

Esta tinción no es específica para las fibras de colágeno aunque proporciona una tinción bastante selectiva para estas fibras.

Después de la desparafinación y la hidratación de las muestras;

Se tiñen con la Hematoxilina de Weigert's que consta de dos soluciones que se mezclan para realizar la tinción:

1. Solución A – Hematoxilina (Ref. Sigma H3136) diluida en etanol al 100%.
2. Solución B – Cloruro Férrico (Ref. Sigma 157740) diluido en agua bidestilada y HCl al 10%.

Posteriormente los portaobjetos se lavan con agua corriente durante 10 minutos.

A continuación, se tiñe con Rojo Sirio usando el reactivo Direct Red 80 (Ref. Sigma 365548) diluido en una solución acuosa de ácido pícrico al 1,3% (Ref. Sigma p6744-1GA) durante 1 hora a temperatura ambiente (RT).

Se lavan las muestras dos veces con agua acidificada (agua destilada con ácido acético al 5%).

Al finalizar cualquiera de las tinciones descritas anteriormente se procede a la deshidratación y montaje de las muestras. Para ello, se introducen los portaobjetos en un gradiente de alcoholes secuencial, pasando por etanol al 50%, etanol al 70%, etanol al 80% y finalmente etanol al 96%, durante 5 minutos en cada punto. A continuación, se introducen los portaobjetos en xileno lo que permite conservar las muestras de tejido a lo largo del tiempo sin que el tejido se vea afectado.

Para finalizar, se procede a montar las muestras, colocando sobre ellas un cubreobjetos después de aplicar una gota de medio de montaje Fluoromont-G® (Ref. SoutherBiotech 0100-01).

### **3.2.2 Análisis histológico de las muestras hepáticas**

Las secciones del hígado embebidas en parafina se tiñeron con H&E y tricrómico de Masson y fueron examinadas e interpretadas por un patólogo experimentado (Dr. Carmelo García-Monzón, Hospital Universitario Santa Cristina, Madrid) que no conocía las características de los animales. El grado de fibrosis se determinó utilizando el sistema de evaluación histológica validado por Brunt et al. 1999 [145]. Los grados de fibrosis se dividen en 0, sin fibrosis; 1, fibrosis perisinusoidal o periportal; 2, fibrosis perisinusoidal y portal/periportal; 3, fibrosis central/central completa; y 4, cirrosis.

### **3.3 Determinación de ácidos biliares presentes en el líquido biliar por cromatografía líquida.**

Primero se extrae el líquido biliar, directamente de la vesícula, en el momento del sacrificio con una jeringa y se transfiere a un tubo eppendorf y se introduce directamente a -80°C para poder preservar todos los ácidos biliares. Las muestras se enviaron al laboratorio de los Dres. Coral Barbas y Francisco Javier Rupérez Pascualena (CEMBIO, Universidad CEU San Pablo, Madrid).

El análisis se realizó según la metodología descrita anteriormente [146] con ligeras modificaciones. Tras diluir las muestras de bilis 1:100 en agua destilada, se extraen los ácidos biliares mediante extracción en fase sólida (solid phase extraction, SPE) usando como adsorbente los cartuchos Oasis HLB 3 cc 60 mg 30 µm de Waters (Milford, MA, EE.UU.). Los cartuchos se acondicionan con metanol y agua, tras cargar la muestra, se lavan con agua y se eluyen los ácidos biliares con metanol. A continuación, el disolvente se evapora y las muestras se resuspenden en metanol:agua (1:1) y se inyectan en el sistema cromatográfico.

El contenido de ácidos biliares en bilis se determinó mediante UHPLC (del inglés “ultra high performance liquid chromatography”) usando un sistema LC 1290 Infinity II conectado a un MS QqQ 6460 como detector, ambos de Agilent Technologies (Santa Clara, CA, EE.UU.). Para la separación se utiliza una columna Zorbax Eclipse Plus C8 2.1x150 mm de 1,8 µm (Agilent Technologies) y un gradiente optimizado con acetonitrilo, metanol y acetato de amonio (pH = 4). Se usan patrones comerciales de Sigma (St. Louis, MO, EE.UU.) para todos los ácidos biliares medidos y ácido D4-desoxicólico como patrón interno (PI). Las curvas de calibración se preparan con 7 concentraciones de cada patrón.

### 3.4 Cultivos celulares.

#### 3.4.1 Línea celular LX2

La línea LX2 es una línea celular de células estelares humanas generada en el 2005 por Xu. L y colaboradores [147]. Dicha línea celular fue generosamente proporcionada por el laboratorio de la Dra. Paloma Martín-Sanz (IIBm, CSIC).

##### ✓ *Mantenimiento de la línea celular LX2*

La línea celular LX2 se mantiene en un medio DMEM que se prepara a partir de:

A. DMEM (HyClone Dulbecco's High Glucose Modified Eagles Medium) con alto contenido en glucosa. (Ref. SH30022.01)

+ 5mL Penicilina/Streptomicina (10 mg/mL) (Millipore Ref. A2213)

+10mL Hepes 1M (Lonza Ref BE17-737E)

B. DMEM (Gibco Dulbecco's High Glucose Modified Eagles Medium) sin Glutamina (Ref. 10938-025)

+5mL Penicilina/Streptomicina (10 mg/mL) (Millipore Ref. A2213)

El medio de cultivo contiene un 50% del medio A y un 50% del medio B suplementado con 2% de suero fetal bovino (FBS) (Hyclone FBS Ref. SV30106.03)

La línea celular LX2 se mantienen en incubación a 37°C, 5% CO<sub>2</sub> y humedad relativa del 95%.

##### ✓ *Tripsinización:*

Cuando las células alcanzan la confluencia, se procede a la división de las placas mediante lavado con PBS y posterior tripsinización parando en proceso con DMEM suplementado con 2% de FBS. La suspensión celular se distribuye entre las placas sembrando la densidad adecuada según las necesidades de cada experimento.

##### ✓ *Conservación, congelación y descongelación de la línea celular LX2.*

Las células LX2 se pueden almacenar congeladas en un crioprotector con nitrógeno líquido a -170°C suspendidas en una mezcla que contiene medio A+B suplementado con 20% de FBS y 10% de dimetilsulfóxido (DMSO) (Ref, D8418. Sigma Aldrich).

La congelación de las células LX2 se realiza tripsinizando las células y parando la reacción en DMEM (A+B) con 2% de FBS. Posteriormente, los viales se centrifugan a

900 rpm durante 5 minutos y el precipitado de células se resuspende en el medio de congelación anteriormente descrito.

Posteriormente se realiza una congelación progresiva:

1º:  $T^a = -20^{\circ}\text{C}$  1-2 horas

2º:  $T^a = -80^{\circ}\text{C}$  15-24 horas

3º:  $T^a = -170^{\circ}\text{C}$  en el criocervador de nitrógeno líquido.

La descongelación de los viales con células hay que realizarla lo más rápidamente posible. Para ello, los viales se pasan directamente del nitrógeno líquido a un baño a  $37^{\circ}\text{C}$ . Una vez descongeladas, las células se resuspenden en un medio con DMEM (A+B) suplementado con FBS al 10% y se mantienen en un incubador a  $37^{\circ}\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  y humedad relativa del 95% tal como se indica anteriormente.

### **3.4.2** Procedimientos experimentales con la línea celular LX2.

✓ *Infección retroviral para el silenciamiento de IRS2 en la línea celular LX2.*

Para el silenciamiento del gen *IRS2* en la línea celular LX2 se usaron partículas lentivirales que se adquirieron a Sigma (Ref. SHCLNV-NM\_003749 MISSION® shRNA Lentiviral Transduction Particles) que portan el gen de resistencia a puromicina. Para asegurarnos el mayor grado de silenciamiento posible adquirimos partículas lentivirales dirigidas frente a 5 secuencias diana diferentes en el gen *IRS2* de manera que obteníamos 5 líneas diferentes. Como control (del inglés mock) se utilizaron partículas lentivirales MISSION® pLKO.1-puro Empty Vector Control Transduction Particles (partículas Scramble (SC)) también de Sigma.

A *día 0* se siembran las células en una placa de 12 pocillos a una confluencia del 50%.

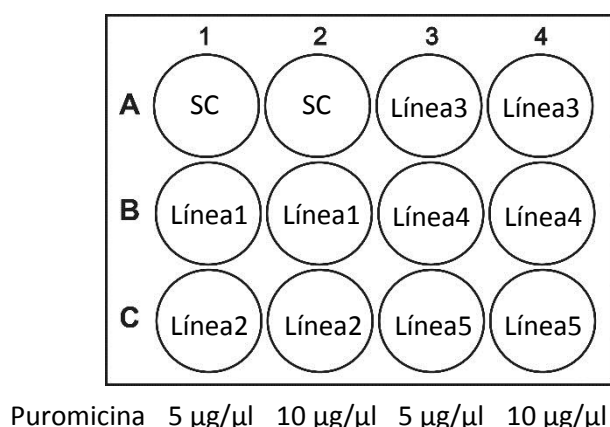
En el *día 1*, las células habían alcanzado el 70% de confluencia y se infectan con las partículas lentivirales shIRS2 y SC durante 24 horas en los volúmenes que se describen a continuación. El índice de MOI usado en la transfección lentiviral fue 0,7.

(100  $\mu\text{l}$  sh (SC o shIRS2) + 900  $\mu\text{l}$  DMEM (A+B) - 2% de FBS + 1  $\mu\text{l}$  de hexabromide (8  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ))

Al día siguiente, *día 2*, se cambia el medio por DMEM (A+B) -2% de FBS eliminando todas las partículas lentivirales del medio.

*Día 3.* Se retira el medio añadido el día anterior y se vuelve a añadir DMEM (A+B) suplementado con 2% de FBS y con el antibiótico puromicina. Este paso es fundamental para seleccionar las células infectadas ya que las células no infectadas

se morirán en presencia de la puromicina. Las dosis de puromicina de partida fueron de 5  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  y 10  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  tal y como se indica en el esquema:



**Figura 8: Selección de las células transfectadas con partículas lentivirales.** Dosis iniciales de puromicina en el experimento de silenciamiento génico de *IRS2* en la línea celular LX2.

En días sucesivos se realiza un cambio de medio cada 2-3 días conservando las mismas dosis de puromicina.

*Día 7.* A los pocillos con puromicina 5  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  se les aumenta la dosis de la misma a 10  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  y a los pocillos con puromicina 10  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  se les aumenta hasta 15  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ .

En días sucesivos se cambia el medio manteniendo estas dosis de puromicina.

A partir de este momento, cuando las células alcanzan la confluencia y ya no se observa muerte celular las células se amplifican pasándolas a placas con un mayor tamaño de pocillo y, finalmente, se procede a su crioconservación. El grado de silenciamiento se determina analizando los niveles de ARNm ó de proteína *IRS2*

✓ *Procedimientos experimentales en la línea celular LX2.*

Para los experimentos realizados en la línea celular LX2, se ayunan las células durante toda la noche y se pretratan con PD98059 (Sigma-Aldrich, CA, USA), inhibidor selectivo de las p42/p44 MAPK, durante 2 horas manteniendo el ayuno de FBS. Posteriormente se estimulan 15 minutos o 24 horas con IGF1 (Ref. 100-11. Preprotech, London, UK) a una concentración de 10 nM. Finalmente las células se recogen como se describe a continuación para realizarse posteriores análisis de Western Blot o inmunofluorescencia.

En los experimentos realizados en las líneas celulares LX2, LX2 shControl y LX2 shIRS2, se ayunan las células durante 2 o 16 horas para posteriormente estimularlas con IGF1 a una dosis de 10 nM durante 15 minutos o 24 horas.

### 3.5 Análisis de proteínas.

#### 3.5.1 Análisis de proteínas mediante Western-Blot.

✓ *Obtención de extractos de proteínas totales de células.*

- Lisado de las células: Las placas de cultivo se lavan dos veces con PBS frío y posteriormente se lisan sobre hielo (4°C) con 50-200 µl tampón de lisis.
- Recogida de células: el lisado se transfiere directamente a un tubo eppendorf de 1.5 ml sobre hielo.
- Centrifugación: Se centrifugan las muestras a 13000 rpm durante 10 minutos a 4°C.
- En el sobrenadante se encuentran las proteínas totales que se transfieren a un tubo nuevo para su inmediato procesamiento o se conservan a -80°C para su posterior análisis.

**Tampón de Lisis de Células: pH 7,5**

EDTA 5mM  
NaCl 50 mM  
Pirofosfato Sódico  
NaF 50mM  
Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 100µM  
Tritón X-100 1%  
PMSF 1mM

✓ *Obtención de extractos de proteínas totales de tejido.*

- Homogeneización del tejido: Se pesa una porción de hígado de aproximadamente 30 mg y de coloca en un tubo al que se añaden 16 volúmenes de tampón de homogeneización manteniendo siempre la muestra en hielo. Para la homogenización se usa el politrón (Polytron System PT 1200E, Kinematica AG) con objeto de homogeneizar bien la muestra.
- Se mantiene el tubo 30 minutos en hielo.
- Centrifugación: Se centrifugan las muestras a 40000 rpm durante 40 minutos a 4°C.
- En el sobrenadante se encuentran las proteínas totales que se transfieren a un tubo nuevo para su inmediato procesamiento o se almacenan a -80°C para su posterior análisis.

**Tampón de Homogeneización de Tejido: pH 7,5**

EDTA 10mM  
Hepes 50mM  
Pirofosfato Sódico  
NaF 0.1M  
Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 10mM  
Tritón X-100 1%  
Leupeptina 10µg/ml  
Aprotinina 10µg/ml  
Benzamidina 2mM

✓ *Cuantificación de proteínas.*

La cuantificación de proteínas se realiza mediante el método de Bradford (1976) por medida espectrofotométrica a una longitud de onda de 595 nm interpolando las medidas en una curva patrón de concentraciones conocidas de albúmina sérica bovina estándar (1 µg/µl).

✓ *Electroforesis de proteínas.*

- Preparación de las muestras: Una vez valorados los extractos proteicos, se calculan los  $\mu\text{g}$  de proteína que debían añadirse de cada una de las muestras de modo que todas tuviesen la misma cantidad de proteína, aproximadamente 20  $\mu\text{g}$ . A continuación, las muestras se ajustan a un mismo volumen final y se les incorpora un tampón de carga 4x. Las muestras se calientan entre 90-100°C durante 5 minutos y se cargan en geles de poliacrilamida-SDS o se almacenan a -80°C hasta el momento de su utilización.
- Geles de poliacrilamida-SDS para la electroforesis: Estos constan de dos partes, un gel concentrador y un gel separador con 8-15% de Acrilamida/Bisacrilamida (BioRad). En los pocillos del gel se cargan las muestras reservando siempre un pocillo para un patrón de pesos moleculares, que contiene una mezcla de proteínas de peso molecular conocido (Ref. B4MWP03 Blue Star Protein Marker) que permite identificar las proteínas objeto de estudio.

**Tampón de carga 4x:**

Tris pH 7,6 100mM  
 Glicerol 10% (v/v)  
 SDS 6% (p/v)  
 Azul de bromofenol 0,2% (p/v)  
 $\beta$  mercaptoetanol 2mM

**Tampón de electroforesis:**

Tris 25mM pH 8,3  
 Glicina 250mM  
 SDS 0,1% (p/v)

**Gel Concentrador:**

Acrilamida 5%  
 Bisacrilamida 0,13%  
 Tris 125mM pH 6,8  
 SDS 0,1% (p/v)  
 Persulfato amónico 0,1% (p/v)  
 TEMED 0,243%

**Gel Separador:**

Acrilamida 8-12%  
 Bisacrilamida 0,265%  
 Tris 375mM pH 8,8  
 SDS 0,1% (p/v)  
 Persulfato amónico 0,1% (p/v)  
 TEMED 0,243%

✓ *Transferencia húmeda de proteínas.*

Una vez separadas las proteínas por electroforesis, se procede a la transferencia de las mismas a una membrana de nitrocelulosa mediante el paso de una corriente eléctrica.

Se usa el equipo de transferencia húmeda de BioRad.

**Tampón de transferencia:**

Tris 66mM pH 8,3  
 Glicina 383 Mm  
 Metanol 20%  
 SDS 0.038%

Se transfieren las proteínas a un amperaje constante de 120 mA por gel durante un tiempo de 2 horas.

✓ *Inmunodetección de las proteínas.*

- *Bloqueo:* Este paso se realiza para saturar los sitios inespecíficos de unión del anticuerpo en las membranas. Para ello, la membrana de nitrocelulosa se incuba en la solución de bloqueo:

Soluciones de bloqueo:	
Leche:	BSA:
5% Leche en polvo desnatada (p/v) en TBS:	3% albúmina sérica bovina (p/v) en TBS:
150 mM NaCl	150 mM NaCl
10 mM Tris pH 7,3	10 mM Tris pH 7,3

- Temperatura: 25°C (RT)
- Tiempo: 1 hora.
- En agitación suave.
- Después del bloqueo las membranas se lavan dos veces con TTBS (Tween-20 0,1%, Tris-HCl 10mM, NaCl 150 mM, pH 7,5)
- *Anticuerpo primario:* se incuban las membranas con el correspondiente anticuerpo primario diluido en TTBS a la dilución recomendada durante toda la noche a 4°C en agitación suave. Los anticuerpos utilizados se muestran en la Tabla 2.
- Después se realizan 3 lavados sucesivos de 10 minutos cada uno con TTBS.
- *Anticuerpo secundario:* se incuban la membranas con el correspondiente anticuerpo secundario diluido en TTBS. Este es un anticuerpo de cabra dirigido contra las inmunoglobulinas de la especie correspondiente (ratón o conejo) y conjugado con la peroxidasa de rábano. Esta incubación se realiza durante una hora a temperatura ambiente en agitación suave.
- Se realizan 3 lavados sucesivos con TTBS, de 5 minutos cada uno, y un lavado final con TBS.
- *Revelado:* Las bandas correspondientes a las proteínas unidas a los anticuerpos se visualizan usando una técnica quimioluminiscente con el reactivo ECL (Biorad Ref 170-5061). Para ello, una vez aplicado el reactivo sobre las membranas éstas se introducen en el visualizador bioluminiscente ImageQuant LAS 4000 mini (GE healthcare) que toma las imágenes a distintos tiempos de exposición.



Anticuerpo	Referencia	Casa Comercial
$\alpha$ SMA	A-2547	Sigma-Aldrich®
Col1a1	SC-8784	Santa Cruz Biotechnology
MMP9	SC-6840	Santa Cruz Biotechnology
pERK 1/2	9101	Cell Signalling
ERK 1/2	9102	Cell Signalling
pAKT (1/2/3) Ser 473	SC-7985-R	Santa Cruz Biotechnology
AKTt	9272	Cell Signalling
pIGF1R	3021	Cell Signalling
IGF1R	SC-713	Santa Cruz Biotechnology

**Tabla 2:** Lista de anticuerpos usados para Western Blot e Inmunofluorescencia

Para el análisis por densitometría de la expresión de proteínas se utilizó el software *ImageJ*.

### 3.5.2 Análisis de la expresión de proteínas mediante inmunofluorescencia.

El análisis de la expresión de proteínas mediante inmunofluorescencia se basa en la capacidad de los anticuerpos marcados con un fluóforo de unirse a una determinada proteína y así demostrar la presencia de las mismas en una preparación de células fijadas.

- Para llevar a cabo la inmunofluorescencia, se siembran las células sobre un cristal de 12 mm de diámetro. Una vez realizado el tratamiento experimental se llevan a cabo los siguientes pasos:
- Se fijan las células en paraformaldehído (PFA) al 4%, durante 10 minutos a temperatura ambiente.
- Posteriormente, se realizan 2 lavados con PBS para eliminar los restos de PFA.
- A continuación, se añade una solución de bloqueo de PBS-3% BSA en para eliminar las uniones inespecíficas del anticuerpo primario, durante una hora.
- Seguidamente se realizan 2 lavados con PBS.
- En el siguiente paso, se incuban los cristales con el anticuerpo primario correspondiente en la dilución recomendada para cada anticuerpo normalmente comprendida entre 1:200 y 1:400 diluido en la solución de bloqueo preparada

anteriormente y se mantienen a 4°C en una cámara húmeda toda la noche, lo anticuerpos utilizados se muestran en la Tabla 2.

- Al día siguiente, se lavan los pocillos 3 veces con PBS y posteriormente se incuban los cristales con el anticuerpo secundario unido a fluoróforo ((Alexa Fluor® 488 goat anti- rabbit IgG (Ref. A11034) o Alexa Fluor® 488 goat anti-mouse IgG (Ref. A11001), ambos de Life Technologies)), durante una hora en oscuridad a temperatura ambiente.
- Finalmente se lavan los pocillos 3 veces con PBS y se procede al montaje de los cristales sobre un portaobjetos utilizando el gel de montaje Fluoromont G® de Southern Biotech (Ref. 0100-01).
- Finalmente se analizan los portaobjetos en un microscopio confocal (Leica TCS SP5 X) y se sacan las fotos representativas.

Para la cuantificación de las imágenes se utilizó el software *ImageJ*.

### **3.6 Análisis de ARN total y PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR).**

#### **3.6.1 Extracción ARN total de tejidos y células.**

La extracción de ARN se realiza siguiendo el método del isotiocianatode guanidina (TRI REAGENT™ MRC gene Ref. TR 118). El reactivo TRI Reagent® contiene fenol e isotiocianatode guanidina en una monofase que es capaz de inhibir la actividad ARNasa. La ventaja de este procedimiento es que es un método de aislamiento de ARN en un solo paso y sin necesidad de añadir ADNasa.

Los protocolos que se realizaron fueron los siguientes.

#### **Tejido (Hígado de ratón):**

- Se pesan 50-100 mg de tejido.
- Se añade 1 ml de Tri Reagent®
- La mezcla se introduce en un potter estéril de 2 ml.
- Se homogenizan las muestras de tejido.
- La mezcla se centrifuga a 12000 rpm, 10 minutos a 4°C.
- El sobrenadante se pasa a un tubo eppendorf estéril

#### **Células:**

- Las placas se lavan con PBS frío.
- Dependiendo de la densidad celular se añade 0,5 - 1 ml de Tri Reagent®
- Se homogeniza con la pipeta y se pasa el homogenado a un tubo eppendorf nuevo.

A partir de aquí el protocolo es idéntico para ambos tipos de muestras:

- Se dejan reposar las muestras 5 minutos a temperatura ambiente.
- Se añaden 100 – 200 µl de cloroformo.
- Se agita con vórtex durante 15 segundos.
- Se dejan reposar las muestras 15 minutos a temperatura ambiente.
- Se centrifuga a 12000 rpm, 15 minutos a 4°C.
- Se recoge la fase superior que contiene el ARN (incoloro) y se pasa a un tubo nuevo.
- Se añaden 250-500 µl de isopropanol.
- Se invierte la mezcla un mínimo 10 veces.
- Se deja reposar 10 minutos a temperatura ambiente.
- Se centrifugan los tubos a 12000 rpm, 10 minutos a 4°C.
- Se retira el sobrenadante por decantación.
- El precipitado se lava con etanol absoluto 96%.
- Se vuelven a centrifugar los tubos a 12000 rpm, 5 minutos a 4°C.
- Se decanta el etanol y se deja secar el pellet.
- Por último se resuspende el precipitado en agua libre de ADNasa/ARNsa en el volumen más conveniente.

Las muestras se analizan en el Nanodrop (Termofisher Nanodrop 2000c) de manera que se cuantifican y se determina su pureza mediante el ratio de absorbancias 260/280/230.

### 3.6.2 Transcripción reversa seguida de PCR.

Una vez obtenido y cuantificado el ARN se realiza la transcripción reversa seguida de PCR, técnica que permite sintetizar ADN complementario (ADNc) a partir de cadenas de ARN usando para ello la enzima transcriptasa reversa. El ADNc obtenido es la cadena complementaria de la cadena molde de ARN.

El kit usado para llevar a cabo este método es el ImProm-II™ Reverse Transcription de Promega (Ref. M314C) y además se usan dNTPs (Ref. C1145) y el inhibidor de ARNasa ARNsin (Ref. N261B).

#### **Mezcla de Reacción 1:**

Oligonucleótidos degenerados  
25 µg/ml  
Agua libre de ADNasas

#### **Mezcla de Reacción 2:**

Agua libre de ADNasas  
Tampón de RT 1x  
MgCl<sub>2</sub> 2,75mM  
dNTPs 0,5 mM  
ARNsin 1U/µl  
Enzima RT

El protocolo de hibridación empleado es el siguiente:

- Desnaturalización inicial a 70°C, 5 minutos.
- Tª 4°C, 2 minutos.
- Tª 25°C, 30 segundos.
- Incubación a 42°C, 1 hora.
- Elongación final a 70°C, 15 minutos.

La mezcla obtenida se puede usar directamente para la amplificación del cADN mediante PCR cuantitativa en tiempo real.

### 3.6.3 Análisis mediante PCR cuantitativa en tiempo real qPCR.

La PCR cuantitativa (qPCR) o PCR en tiempo real, variante de la PCR a tiempo final, es utilizada para amplificar y simultáneamente cuantificar de forma absoluta el producto de la amplificación de ADN. Para ello, emplea del mismo modo que la PCR convencional un molde de ADN, al menos un par de oligonucleótidos específicos del gen que queremos analizar, un tampón de reacción adecuado y una ADN polimerasa termoestable.

El método usado fue el de SYBR Green I que es un colorante fluorescente comúnmente usado que se une las moléculas de ADN de doble hebra intercalándose entre las bases de ADN a medida que se amplifica el ADN en cada ciclo de reacción. De ésta manera se puede cuantificar en tiempo real el producto de amplificación al terminar cada ciclo de amplificación.

El protocolo de hibridación utilizado fue el siguiente:

**Mezcla de reacción.**

Muestra cDNA – 1 µl

Oligo sentido 0,3 µM

Oligo antisentido 0,3 µM

CXR 0,3 µM

SYBR® Green I 1x

- Tª 50°C, 2 minutos.
- $\left( \begin{array}{l} \text{Activación a 95°C, 3 minutos.} \\ \text{Desnaturalización a 95°C, 15 segundos.} \\ \text{Anillamiento/Elongación a 60°C, 1 minuto.} \end{array} \right) \times 40 \text{ ciclos.}$
- Disociación 60-95°C. 15 minutos.

Los oligonucleótidos que se han usado son los siguientes (todos procedentes de Metabion (Laboratorios Conda):

<i>m-Col1a1</i>	Sentido	AGCACTCGCCCTCCCGTCTT
	Anti-sentido	AATGGCACGGCTGTGTGCGA
<i>m-αSma</i>	Sentido	CCCAGACATCAGGGAGTAATGG
	Anti-sentido	TCTATCGGATACTTCAGCGTCA
<i>m-Tgfβ</i>	Sentido	AGCCCTGTATTCCGTCTCCT
	Anti-sentido	ATTCCTGGCGTTACCTTGG
<i>m-Igf1</i>	Sentido	TCAACAAGCCCACAGGCTATG
	Anti-sentido	GCTCCGGAAGCAACACTCAT
<i>m-Igf2</i>	Sentido	TTCCAGGTACCAATGGGGAT
	Anti-sentido	ACTGAAGCGTGTCAACAAGC
<i>m-Igf1r</i>	Sentido	GGCACAACACTACTGCTCCAAAG
	Anti-sentido	GGGATTTTCCGTACCTCCTC
<i>m-Ptpn1</i>	Sentido	GAAGGCAGAGCCCAGTCAAG
	Anti-sentido	CCCACCATCCGTCTCCTAACT
<i>m-Irs1</i>	Sentido	CTCCTGCTAACATCCACCTTG
	Anti-sentido	AGCTCGCTAACTGAGATAGTCAT
<i>m-Irs2</i>	Sentido	ACCGACTTGGTCAGCGAAG
	Anti-sentido	CACGAGCCCGTAGTTGTCAT
<i>m-ligando de Fas</i>	Sentido	ACCCCCACTCAAGGTCCAT
	Anti-sentido	CGAAGTACAACCCAGTTTCGT
<i>m-Bim</i>	Sentido	CGACAGTCTCAGGAGGAACC
	Anti-sentido	CCTTCTCCATACCAGACGGA
<i>m-Trail</i>	Sentido	GAAGACCTCAGAAAGTGGC
	Anti-sentido	GACCAGCTCTCCATTCTA
<i>m-Gapdh</i>	Sentido	TGGAAGAGTGGGAGTTGCTGT
	Anti-sentido	CCTGGAGAAACCTGCCAAGTA
<i>m-Mmp2</i>	Sentido	GCGATGTCGCCCCTAAAAC
	Anti-sentido	GCAGCCATAGAAAGTGTTCAAGTA
<i>m-Mmp9</i>	Sentido	AAACCTTCAAAGGCCTCAAGTG
	Anti-sentido	GTCTCGCGGCAAGTCTTCAG
<i>m-Pai1</i>	Sentido	ATGACTGGGTGGAAAGGCATAC
	Anti-sentido	CAGGCGTGTCAGCTCGTCTA
<i>m-Timp1</i>	Sentido	AGGTGGTCTCGTTGATTCGT
	Anti-sentido	GTAAGGCCTGTAGCTGTGCC
<i>m-Ho1</i>	Sentido	CACAGATGGCGTCACTTCGTC
	Anti-sentido	GTGAGGACCCACTGGAGGAG

**Tabla 3:** Lista de olidonucleótidos empleados en la RT-qPCR.

### 3.7 Análisis estadístico.

Las tablas y las representaciones gráficas se han elaborado utilizando los valores medios  $\pm$  los errores estándar de las medias (SEM). Las diferencias significativas se han determinado mediante el test t de student y test anova (Test a posteriori de Bonferroni). El software usado para la representación gráfica de los valores, así como también para el análisis estadístico ha sido el GraphPad Prism 5.01. Se consideran diferencias estadísticamente significativas cuando  $p < 0,05$ .

## **4. RESULTADOS**

#### **4.1 Caracterización del proceso fibrótico asociado a colestasis biliar en un modelo murino deficiente en el gen *Irs2* e identificación de las dianas clave del proceso fibrogénico que resultan afectadas en este modelo.**

El primer objetivo de esta Tesis Doctoral consistió en analizar el papel del IRS2 en la aparición y progresión del proceso fibrótico en el hígado. Para poder llevarlo a cabo, los ratones de genotipo salvaje (WT) y deficientes en el gen *Irs2* (IRSKO) de 2-3 meses de edad se sometieron a la cirugía de ligadura del conducto biliar (BDL), un modelo experimental ampliamente usado para inducir fibrosis hepática derivada de un daño colestásico, y se sacrificaron a los 3, 7 y 28 días tras la operación. Al finalizar los distintos tiempos experimentales se recolectaron los hígados y los sueros de los animales para su posterior análisis.

Los ratones usados en el estudio fueron hembras puesto que los machos de dicha edad presentan ya una exacerbada resistencia a la insulina en el hígado que se manifiesta por una elevada gluconeogénesis y, además, la gran mayoría de ellos desarrollan DMT2 con elevados niveles de glucosa en sangre (>400 mg/dl) [127]. De esta manera, se eliminaron todos los efectos metabólicos derivados del estado diabético severo que presentan los machos IRS2KO, ya que como se ha indicado en la sección de *Introducción* las hembras desarrollan únicamente una hiperglucemia moderada [148].

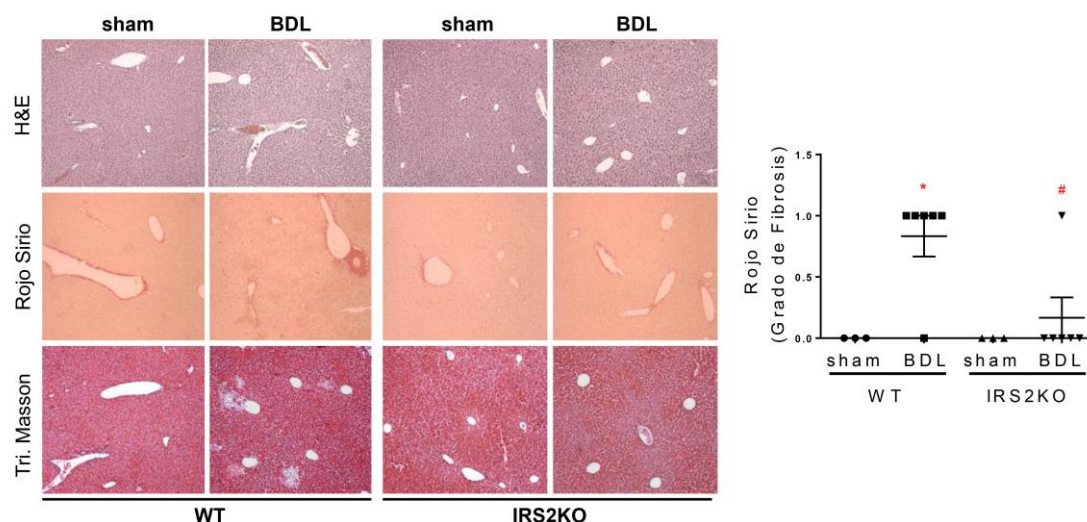
##### **4.1.1 La ausencia de IRS2 produce un retraso en la aparición del proceso fibrótico en el hígado de los ratones a los 3 días post-BDL.**

Inicialmente, se realizó la cirugía de la BDL en ratones WT e IRS2KO, y a los 3 días siguientes se sacrificaron los animales recogiendo el hígado y el suero para su posterior análisis. Como controles experimentales se utilizaron ratones de ambos genotipos que fueron sometidos a un procedimiento quirúrgico similar, pero sin ligar el conducto biliar (del inglés “sham”).

En primer lugar, se determinó el grado de fibrosis hepática. Para ello, se realizaron tinciones de varias secciones de los hígados de estos animales con hematoxilina-eosina, tricrómico de Masson y rojo sirio, que fueron evaluadas por un patólogo experimentado en modo ciego. El análisis histopatológico reveló que tras el procedimiento de BDL los ratones de genotipo WT comenzaron a desarrollar cierto grado de fibrosis que fue especialmente notable en las zonas perivasculares en las cuales se observaban engrosamientos ductales, primera evidencia de fibrosis hepática. Sin embargo, en los ratones IRS2KO sometidos a BDL no se apreció apenas



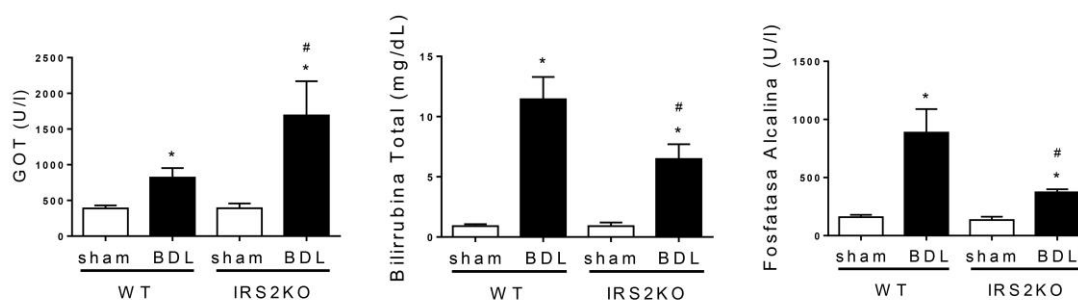
la aparición del proceso fibrótico reflejado en el grado de fibrosis ni se observaron los engrosamientos ductales (Figura 9).



**Figura 9. Análisis histológico de los hígados procedentes de ratones WT e IRS2KO a los 3 días post-BDL.** (panel izqdo.) Imágenes representativas (20x) de tinciones de hematoxilina-eosina, rojo sirio y tricrómico de Masson realizadas en secciones de los hígados. (panel dcho.) Representación de los valores del grado de fibrosis. Los valores del grado de fibrosis del análisis histopatológico se han representado según la escala de Brunt et al, 1999 [145]. Grupo experimental: ratones de genotipo salvaje (WT) y deficientes en el gen *Irs2* (IRSKO) sometidos a la BDL durante 3 días (BDL), y sus correspondientes controles (sham).

\*  $p < 0.05$ , BDL vs. sham; #  $p < 0.05$ , IRS2KO vs. WT. (n= 6-8 animales por condición).

Como era de esperar, el análisis de los niveles séricos de la glutámico oxalacético transaminasa (GOT), bilirrubina total y fosfatasa alcalina reveló que, a los 3 días post-BDL, el daño hepático y biliar producido fue mayor en los ratones operados con respecto a sus controles. Curiosamente, los niveles de la GOT, marcador de daño celular, aumentaron de manera significativa en el suero de los ratones IRS2KO operados con respecto a los animales WT de la misma condición, mientras que se observó que los niveles de bilirrubina total fueron menores en los ratones IRS2KO que en los WT, siendo esta diferencia estadísticamente significativa entre ambos genotipos. Asimismo, el marcador sérico de daño biliar, fosfatasa alcalina se encontró en niveles más bajos en los ratones IRS2KO que en los correspondientes de genotipo WT (Figura 10).

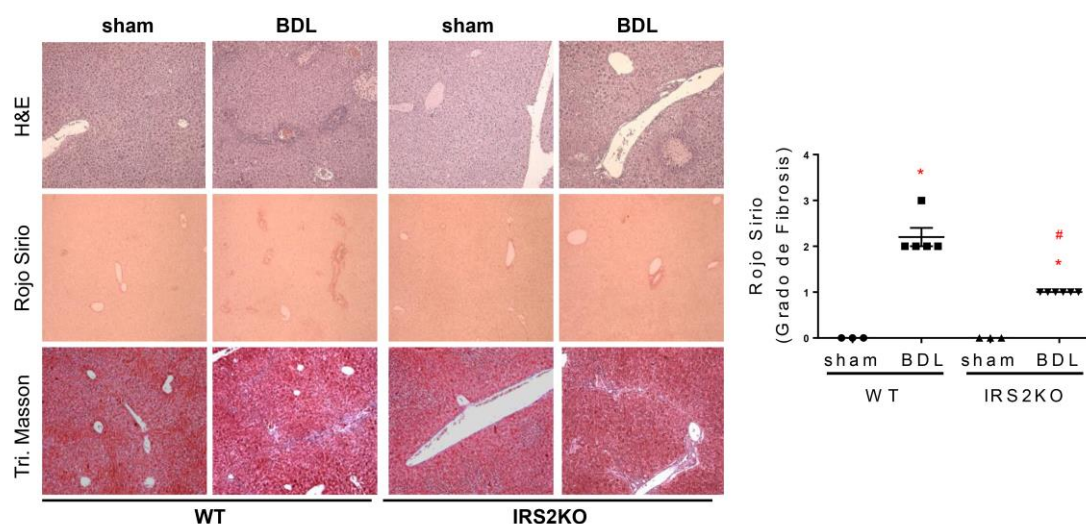


**Figura 10. Análisis de marcadores de daño hepático en el suero procedente de ratones WT e IRS2KO a los 3 días post-BDL.** Niveles séricos de glutámico oxalacético transaminasa GOT (U/l), bilirrubina total (mg/dL) y fosfatasa alcalina (U/l). Grupo experimental: ratones de genotipo salvaje (WT) y deficientes en el gen *Irs2* (IRS2KO) sometidos a la BDL durante 3 días (BDL), y sus correspondientes controles (sham).

\*  $p < 0.05$ , BDL vs. sham; #  $p < 0.05$ , IRS2KO vs. WT. (n= 6-8 animales por condición).

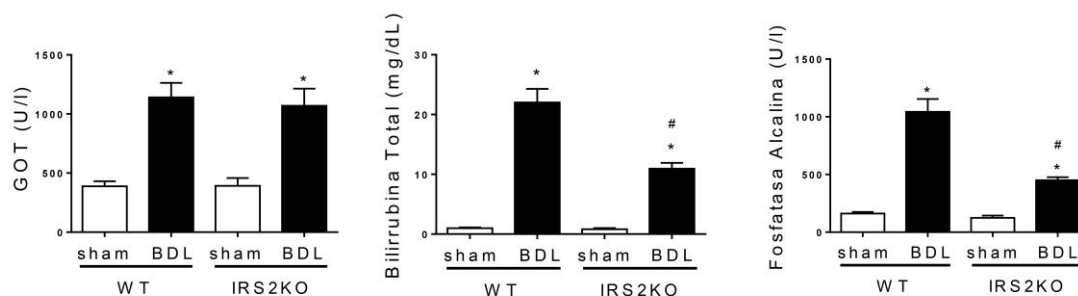
#### 4.1.2 La falta de IRS2 produce un retraso en el daño biliar y en el desarrollo del proceso fibrótico en ratones a los 7 días post-BDL.

Para continuar con el análisis del papel del IRS2 en el desarrollo del proceso fibrótico inducido por daño biliar, se realizó la cirugía de BDL a otro grupo de ratones WT e IRS2KO que se sacrificaron 7 días después de la operación junto con sus respectivos controles (sham). Después del sacrificio y recogida de muestras se realizaron las tinciones histológicas correspondientes en varias secciones de hígado, así como el análisis histopatológico de las mismas, comprobando que los animales IRS2KO presentaron un retraso en la progresión del proceso fibrótico, en comparación con los animales WT operados en las mismas condiciones (Figura 11). Transcurridos 7 días tras la cirugía, en los animales WT se observó como la fibrosis no era simplemente perivascular, sino que las fibras de colágeno se depositaron dentro del parénquima hepático. Sin embargo, a este tiempo post-BDL, en los ratones IRS2KO se comenzaron a observar los engrosamientos ductales en las zonas perivasculares del tejido hepático, indicando el inicio del proceso fibrótico. Además, los ratones IRS2 presentaron un menor grado de fibrosis que era estadísticamente significativo en comparación con los ratones WT (Figura 11).



**Figura 11. Análisis histológico de los hígados procedentes de ratones WT e IRS2KO a los 7 días post-BDL.** (panel izqdo.) Imágenes representativas (20x) de tinciones de hematoxilina-eosina, rojo sirio y tricrómico de Masson realizadas en secciones de los hígados. (panel dcho.) Representación de los valores del grado de fibrosis. Los valores del grado de fibrosis del análisis histopatológico se han representado según la escala de Brunt et al, 1999 [145]. Grupo experimental: ratones de genotipo salvaje (WT) y deficientes en el gen *Irs2* (IRSKO) sometidos a la BDL durante 7 días (BDL), y sus correspondientes controles (sham).  
\*  $p < 0.05$ , BDL vs. sham; #  $p < 0.05$ , IRS2KO vs. WT. (n= 6-8 animales por condición).

El análisis de los niveles séricos de GOT, bilirrubina total y fosfatasa alcalina revelaron que a los 7 días tras la BDL los ratones de ambos genotipos presentaron un mayor grado de daño hepático y biliar comparados con sus correspondientes controles sin BDL. Asimismo, los niveles de actividad GOT fueron similares en ambos grupos de ratones, mientras que los niveles de bilirrubina fueron más bajos en los ratones IRS2KO operados en comparación con los WT, indicando un menor daño hepático en ausencia de IRS2. Esto mismo se observó en los niveles de fosfatasa alcalina que también fueron significativamente más bajos en los ratones IRS2KO (Figura 12).



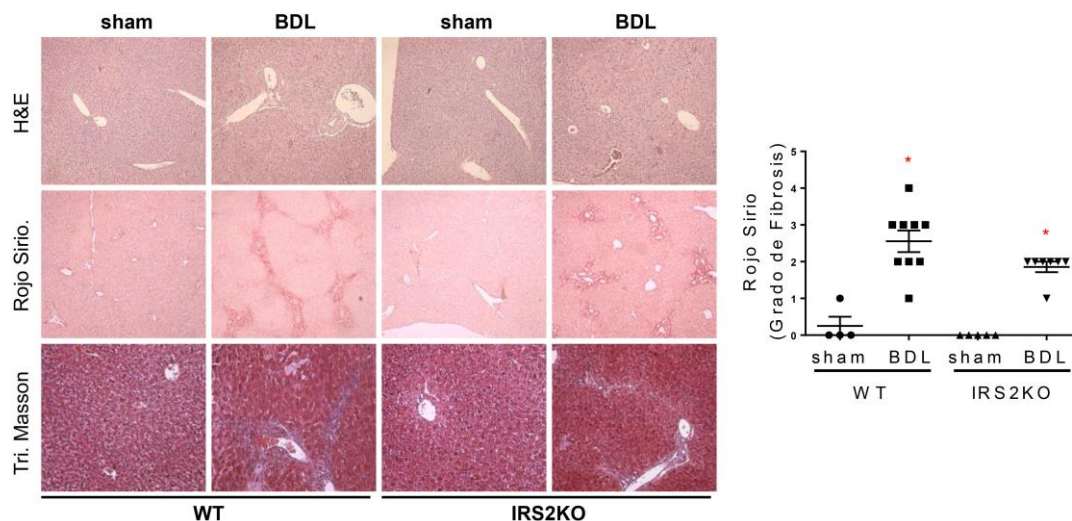
**Figura 12. Análisis de marcadores de daño hepático en el suero procedente de ratones WT e IRS2KO a los 7 días post-BDL.** Niveles séricos de glutámico oxalacético transaminasa GOT (U/l), bilirrubina total (mg/dL) y fosfatasa alcalina (U/l). Grupo experimental: ratones de genotipo salvaje (WT) y deficientes en el gen *Irs2* (IRSKO) sometidos a la BDL durante 7 días (BDL), y sus correspondientes controles (sham).

\*  $p < 0.05$ , BDL vs. sham; #  $p < 0.05$ , IRS2KO vs. WT. (n= 6-8 animales por condición).

#### 4.1.3 La deficiencia en IRS2 no altera el grado de fibrosis alcanzado a los 28 días después de la BDL.

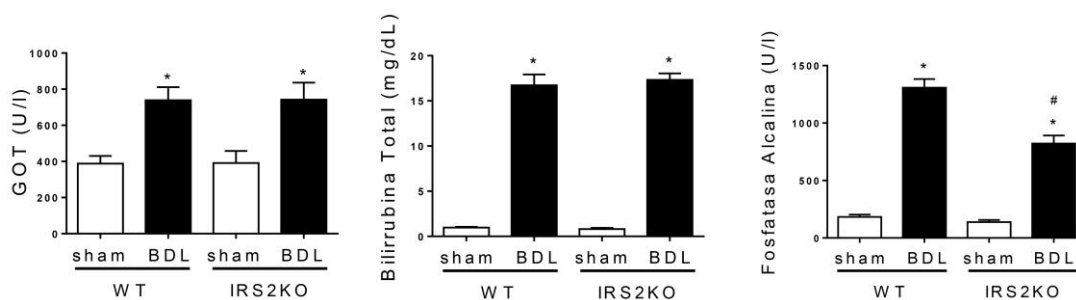
Para el análisis del papel del IRS2 a un tiempo más largo en el desarrollo del proceso fibrótico inducido por un daño biliar se realizó la BDL a un tercer grupo de ratones de ambos genotipos que se sacrificaron a los 28 días después de la operación, tiempo en el que está descrito que los ratones desarrollan una fibrosis severa [45]. Al igual que con los grupos anteriores, se llevaron en paralelo los correspondientes controles (sham). Después del sacrificio de los animales, se recogieron las muestras de hígado y suero para su posterior análisis.

La evaluación histopatológica de las tinciones del tejido hepático no reveló diferencias significativas entre los animales operados de los dos genotipos a este tiempo final de 28 días, encontrando en ambos grupos de ratones un grado de fibrosis mucho más elevado que en los tiempos más tempranos analizados (Figura 13).



**Figura 13. Análisis histológico de los hígados procedentes de ratones WT e IRS2KO a los 28 días post-BDL.** (panel izqdo.) Imágenes representativas (20x) de tinciones de hematoxilina-eosina, rojo sirio y tricrómico de Masson realizadas en secciones de los hígados. (panel dcho.) Representación de los valores del grado de fibrosis. Los valores del grado de fibrosis del análisis histopatológico se han representado según la escala de Brunt et al, 1999 [145]. Grupo experimental: ratones de genotipo salvaje (WT) y deficientes en el gen *Irs2* (IRSKO) sometidos a la BDL durante 28 días (BDL), y sus correspondientes controles (sham).  
\*  $p < 0.05$ , BDL vs. sham; #  $p < 0.05$ , IRS2KO vs. WT. (n= 8-12 animales por condición).

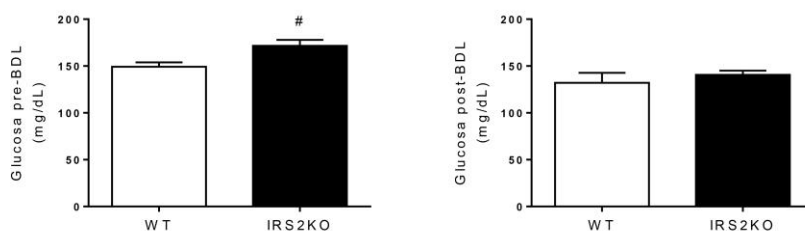
Además, los niveles séricos de GOT y bilirrubina aumentaron de igual manera en los ratones WT e IRS2KO operados respecto a sus controles a los 28 días después de la cirugía de BDL, sugiriendo que no existen diferencias entre genotipos en el grado de daño hepático. A nivel de daño biliar, los ratones operados de ambos genotipos presentaron mayores niveles séricos de fosfatasa alcalina comparados con sus respectivos controles, siendo todavía significativamente menores en el suero de los ratones IRS2KO a este tiempo final (Figura 14).



**Figura 14. Análisis de marcadores de daño hepático en el suero procedente de ratones WT e IRS2KO a los 28 días post-BDL.** Niveles séricos de glutámico oxalacético transaminasa GOT (U/l), bilirrubina total (mg/dL) y fosfatasa alcalina (U/l). Grupo experimental: ratones de genotipo salvaje (WT) y deficientes en el gen *Irs2* (IRS2KO) sometidos a la BDL durante 28 días (BDL), y sus correspondientes controles (sham).

\*  $p < 0.05$ , BDL vs. sham; #  $p < 0.05$ , IRS2KO vs. WT. (n= 8-12 animales por condición).

Nuestra curiosidad nos llevó a analizar los niveles de glucosa en sangre de los ratones sometidos a BDL tras 28 días post-cirugía y no se encontraron diferencias significativas entre la glucemia de los ratones IRS2KO operados en comparación con los ratones WT operados, aunque los niveles de glucosa basal antes de realizar la BDL fueron ligeramente mayores en las hembras IRS2KO como correspondía a su fenotipo metabólico (Figura 15). Estos resultados nos indican que los cambios producidos a nivel histológico o molecular por la ausencia de IRS2 no fueron debidos a una hiperglucemia exacerbada en los animales.



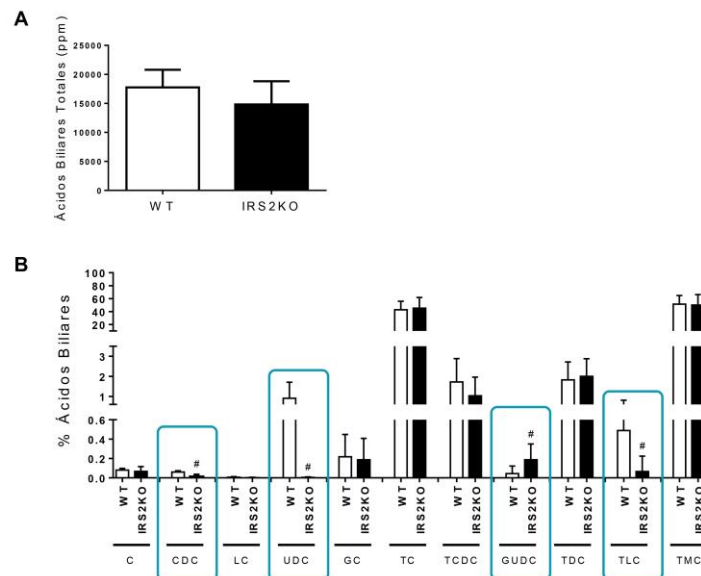
**Figura 15. Determinación de la glucemia en los ratones WT e IRS2KO antes y 28 días tras BDL.** Niveles de glucosa (mg/dL) en sangre. Grupo experimental: ratones de genotipo salvaje (WT) y deficientes en el gen *Irs2* (IRS2KO) antes (*panel izquierdo*.) y tras ser sometidos a la BDL durante 28 días (*panel derecho*.).

#  $p < 0.05$ , IRS2KO vs. WT. (n= 8-12 animales por condición).

#### 4.1.4 La ausencia de IRS2 modifica la síntesis de diferentes ácidos biliares acumulados en la vesícula biliar tras la BDL.

A continuación, se estudió si el retraso en la progresión del proceso fibrótico inducido por el daño biliar en los ratones IRS2KO era debido a una síntesis diferencial de ácidos biliares entre genotipos. Para ello, se extrajo el líquido biliar acumulado debido al proceso de BDL pinchando con una jeringa la vesícula biliar en el momento del sacrificio, y el contenido en ácidos biliares se analizó por espectrometría de masas en el laboratorio de metabolómica de los Dres. Coral Barbas y Francisco J. Rupérez Pascualena (CEMBIO, Universidad CEU San Pablo, Madrid).

El análisis de los resultados reveló que no existían diferencias en la cantidad total de ácidos biliares presentes en el líquido biliar extraído de la vesícula de los ratones WT e IRS2KO analizados a los 28 días post-BDL (Figura 16A). Sin embargo, tras un análisis más detallado se observó que los ratones IRS2KO operados mostraron un porcentaje menor de 3 ácidos biliares en comparación con los ratones WT operados: el ácido quenodeoxicólico (CDC), ácido biliar primario con gran capacidad membranolítica debido a su gran hidrofobicidad, el ácido ursodeoxicólico (UDC), ácido biliar secundario con baja capacidad membranolítica por su poca hidrofobicidad, y el ácido taurolitocólico (TLC), el ácido biliar con mayor capacidad de generar estrés oxidativo. Por otro lado, el glucoursodeoxicólico (GUDC), derivado del UDC conjugado con glicina, se encontró aumentado en los ratones IRS2KO en comparación con los ratones WT a los 28 días post-cirugía (Figura 16B).



**Figura 16. Análisis mediante espectrometría de masas de los ácidos biliares acumulados en la vesícula biliar de los ratones WT e IRS2KO a los 28 días post-BDL.** **A.** Niveles de ácidos biliares totales (ppm). **B.** Porcentaje de ácidos biliares: C, CDC, LC, UDC, GC, TC, TCDC, GUDC, TDC, TLC y TMC. Grupo experimental: ratones de genotipo salvaje (WT) y deficientes en el gen *Irs2* (IRS2KO) sometidos a la BDL durante 28 días. #  $p < 0.05$ , IRS2KO vs. WT. (n= 8-12 animales por condición).

#### 4.1.5 La falta de IRS2 modifica la expresión génica de los principales marcadores fibrogénicos en el hígado.

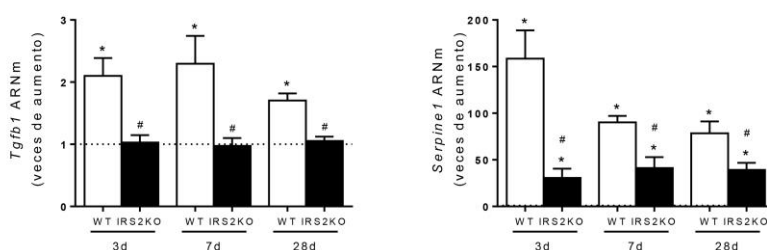
Teniendo en cuenta los resultados anteriores, se continuó con el estudio de los genes involucrados en el proceso fibrótico para poder determinar las causas por las que los ratones IRS2KO sometidos a la BDL presentaron un retraso en la aparición y en el desarrollo de fibrosis asociada a daño colestásico a los 3 y 7 días post-cirugía. Para ello, se analizaron mediante RT-qPCR los principales genes fibrogénicos en los hígados de los grupos de ratones de genotipos WT e IRS2KO que fueron operados y posteriormente sacrificados a los 3, 7 y 28 días.

Como se ha indicado en la introducción, el TGF $\beta$ 1 es una proteína multifuncional que se caracteriza por participar en el desencadenamiento del proceso fibrótico en el hígado, siendo capaz de activar a las HSC. El análisis de la expresión de ARNm de *Tgfb1* mediante RT-qPCR reveló que los ratones WT doblaron sus niveles en los 3 tiempos post-BDL estudiados en comparación con los correspondientes ratones control (sham) del mismo genotipo, mientras que los ratones IRS2KO operados no



aumentaron los niveles de expresión del gen *Tgfb1* en ninguno de los 3 tiempos analizados (Figura 17).

Por otro lado, el análisis de la expresión génica del inhibidor del activador del plasminógeno 1 (*Serpine 1*), que codifica para la proteína PAI1 implicada en la deposición de matriz extracelular en los procesos colestásicos, mostró que los niveles de este inhibidor fueron mucho más elevados en los ratones WT operados a los 3, 7 y 28 días que los niveles detectados en los ratones IRS2KO operados, siendo estas diferencias de expresión estadísticamente significativas en todos los tiempos post-BDL (Figura 17).



**Figura 17. Análisis de los marcadores fibrogénicos *Tgfb1* y *Serpine1* en los hígados procedentes de los ratones WT e IRS2KO tras la BDL.**

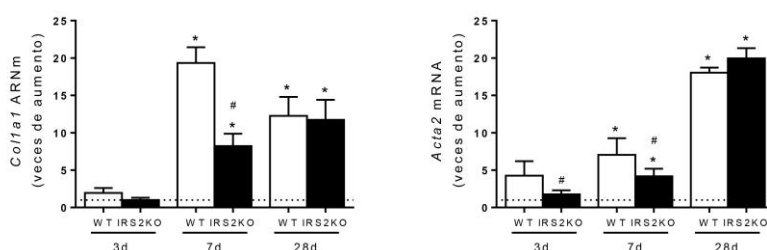
Determinación mediante RT-qPCR de los niveles de ARNm del factor de crecimiento transformante beta (*Tgfb1*) y del inhibidor del activador del plasminógeno 1 (*Serpine 1*). Los datos están expresados como veces de aumento con respecto a los ratones control (sham) y están representados como la media  $\pm$  SEM. Grupo experimental: ratones de genotipo salvaje (WT) y deficientes en el gen *Irs2* (IRSKO) sometidos a la BDL durante 3, 7 y 28 días (BDL), y sus correspondientes controles (sham).

\*  $p < 0.05$ , BDL vs. sham; #  $p < 0.05$ , IRS2KO vs. WT. (n= 6-12 animales por condición).

Asimismo, el contenido de ARNm de colágeno tipo 1 (*Col1a1*), la principal proteína de la matriz extracelular, no varió a los 3 días post-BDL ni en los ratones WT ni en los ratones IRS2KO operados, al contrario que ocurre con el resto de marcadores fibrogénicos estudiados. Sin embargo, se observó que a los 7 días post-BDL los ratones WT aumentaron de manera muy significativa la expresión génica del *Col1a1* en comparación con los ratones control (sham) del mismo genotipo, mientras que en los ratones IRS2KO esta elevación fue mucho menor. El análisis a los 28 días post-BDL de este marcador indicó que los niveles de *Col1a1* en los hígados de los ratones WT e IRS2KO operados aumentaron significativamente con respecto a sus controles

(sham), pero sin observarse diferencias significativas entre los dos genotipos (Figura 18).

Por último, se analizaron los niveles de expresión génica de la  $\alpha$  actina del músculo liso (*Acta2*), que codifica para la proteína  $\alpha$ SMA, principal indicador de la activación de las HSC encargadas de desencadenar el proceso fibrótico en el hígado, encontrando que tanto a los 3 como a los 7 días post-BDL los ratones IRS2KO no alcanzaron los niveles de expresión génica detectados en los hígados de los ratones WT operados en comparación con los controles (sham) de cada genotipo, mientras que a los 28 días ya no se observaron estas diferencias (Figura 18).



**Figura 18. Análisis de los marcadores fibrogénicos *Col1a1* y *Acta2* en los hígados procedentes de los ratones WT e IRS2KO tras la BDL.**

Determinación mediante RT-qPCR de los niveles de ARNm de *Col1a1* y *Acta2*. Los datos están expresados como veces de aumento con respecto a los ratones control (sham) y están representados como la media  $\pm$  SEM. Grupo experimental: ratones de genotipo salvaje (WT) y deficientes en el gen *Irs2* (IRSKO) sometidos a la BDL durante 3, 7 y 28 días (BDL), y sus correspondientes controles (sham).

\*  $p < 0.05$ , BDL vs. sham; #  $p < 0.05$ , IRS2KO vs. WT. (n= 6-12 animales por condición).

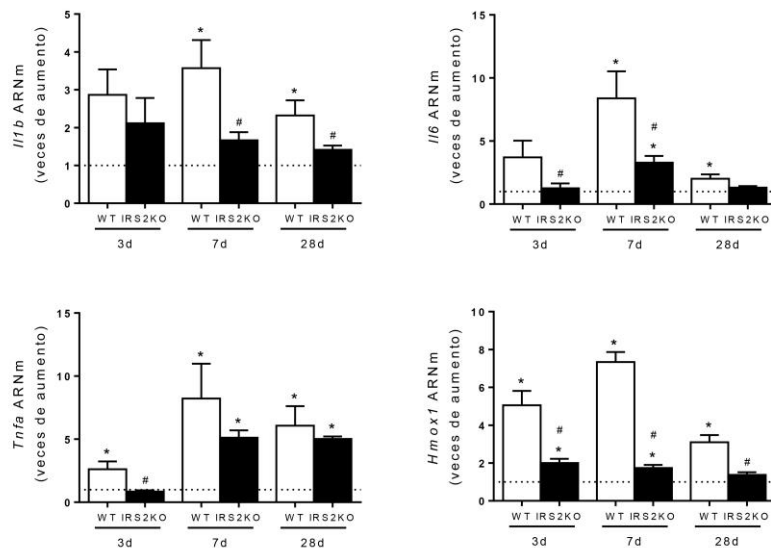
El análisis de todos estos marcadores fibrogénicos en el hígado mostró, en concordancia con el estudio histológico, que los ratones IRS2KO operados presentaron un retraso en la aparición y en la progresión del proceso fibrótico asociado al daño biliar.

#### 4.1.6 La ausencia de IRS2 disminuye el componente inflamatorio asociado al proceso fibrótico debido a la colestasis biliar.

Para el estudio del proceso inflamatorio asociado al desarrollo de fibrosis en los hígados de los ratones WT e IRS2KO sometidos a BDL se midieron los niveles de expresión génica de las principales citoquinas proinflamatorias mediante RT-qPCR.

En relación a la interleuquina 1 beta (*Il1b*), citoquina proinflamatoria producida por la activación de macrófagos en respuesta al daño, el análisis mostró que a los 7 y 28 días post-cirugía la elevación de su expresión génica en el hígado de los ratones IRS2KO fue mucho menor que en los ratones WT, sin observarse diferencias significativas entre ambos genotipos a los 3 días después de la cirugía. Además, el aumento de los niveles de expresión de la interleuquina 6 (*Il6*), citoquina también secretada por macrófagos y hepatocitos, alcanzado en los hígados de ratones IRS2KO a los 3 y 7 días después de la cirugía fue mucho menor que el detectado en los ratones WT a esos mismos tiempos, mientras que a los 28 días tras la cirugía no se observaron diferencias significativas entre ambos genotipos. La última citoquina proinflamatoria estudiada fue el factor de necrosis tumoral alfa (*Tnfa*), citoquina que estimula la fase aguda de la reacción inflamatoria, y se observó una menor expresión en los hígados de los ratones IRS2KO operados en comparación con los ratones WT que alcanzó significatividad estadística únicamente a los 3 días post-BDL (Figura 19). A continuación, se estudiaron los niveles de expresión génica de la hemoxigenasa 1 (*Hmox1*), diana principal del factor de transcripción antioxidante *Nrf2*, observándose que el aumento detectado en los hígados de los ratones IRS2KO a los 3, 7 y 28 días después de la cirugía fue mucho menor en comparación con los valores encontrados en los ratones WT en todos los tiempos post-BDL analizados (Figura 19).

Todos estos resultados apuntan a un retraso en la aparición del proceso inflamatorio y del estrés oxidativo asociado al daño colestásico en los ratones IRS2KO en comparación con los de genotipo WT.



**Figura 19. Análisis de los marcadores proinflamatorios *Il1b*, *Il6* y *Tnfa* y del gen antioxidante *Hmox* en los hígados procedentes de los ratones WT e IRS2KO tras la BDL.** Determinación mediante RT-qPCR de los niveles de mRNA de la interleuquina 1 beta (*Il1b*), interleuquina 6 (*Il6*), factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (*Tnfa*) y hemoxigenasa 1 (*Hmox1*). Los datos están expresados como número de veces de aumento con respecto a los ratones control (sham) y están representados como la media  $\pm$  SEM. Grupo experimental: ratones de genotipo salvaje (WT) y deficientes en el gen *Irs2* (IRSKO) sometidos a la BDL durante 3, 7 y 28 días (BDL), y sus correspondientes controles (sham).

\*  $p < 0.05$ , BDL vs. sham; #  $p < 0.05$ , IRS2KO vs. WT. (n= 6-12 animales por condición).

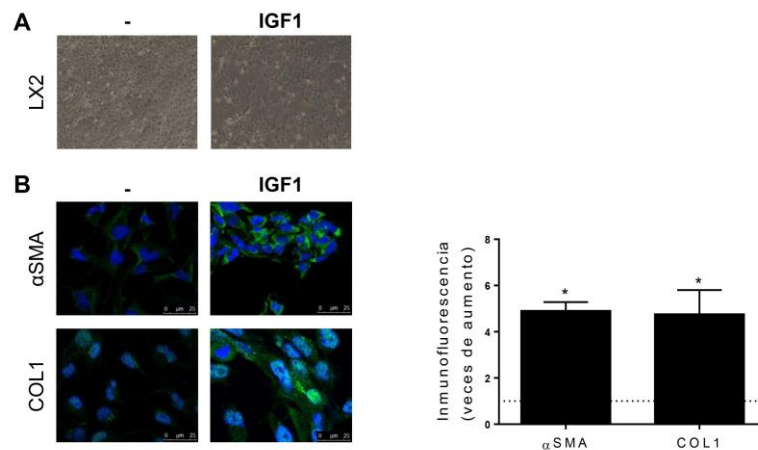
Los resultados obtenidos hasta el momento sugieren que la falta de IRS2 retrasa la aparición y desarrollo del proceso fibrótico inducido por el daño colestásico que podría ser debido a un retraso en el daño inflamatorio y oxidativo que conduce a la activación de las HSC.

## **4.2 Estudio mecanístico de la ruta de señalización que conlleva a la activación de las HSC inducida por el IGF1: evaluación del papel de IRS2 en este proceso celular.**

Una vez descrito el fenotipo de la progresión de la fibrosis hepática en los ratones IRS2KO y WT tras la BDL, se ha analizado a nivel molecular el impacto de la ausencia del IRS2 en la activación de las HSC que, como ya se ha comentado, son esenciales en el proceso fibrótico. Como modelo celular se ha trabajado con la línea de HSC humana LX2 que ha sido ampliamente utilizada para el estudio de los mecanismos moleculares asociados a la fibrosis hepática, y se utilizó el factor de crecimiento IGF1 como inductor de la activación de las HSC debido a que el IRS2 es una molécula clave en su ruta de señalización.

### **4.2.1 El IGF1 activa las HSC y promueve su diferenciación a miofibroblastos.**

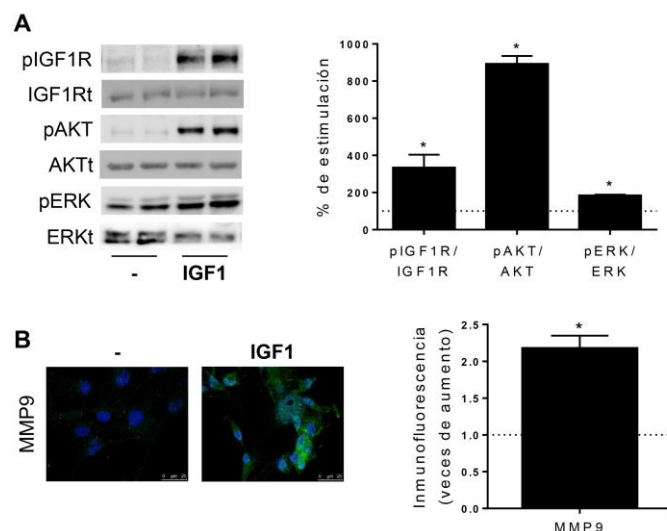
En los primeros experimentos realizados se estimularon las células LX2 con IGF1 a una concentración de 10 nM durante 24 horas, tal como se indica en la sección de *Materiales y Métodos*. En las imágenes por contraste de fases que se tomaron tras el tratamiento se observó que las células que recibieron IGF1 mostraron características morfológicas de HSC activadas, un fenotipo característico de los miofibroblastos, en comparación con las células control que no habían sido estimuladas (Figura 20A). A continuación, se sembraron las células sobre cristales y se sometieron a las mismas condiciones de estimulación para realizar ensayos de inmunofluorescencia para así detectar los niveles de las proteínas  $\alpha$ SMA y COL1, marcadores de activación de las HSC. La cuantificación de las imágenes obtenidas indicó que la expresión de ambas proteínas aumentó de manera significativa en las células LX2 estimuladas con IGF1 en comparación con sus respectivos controles no estimulados (Figura 20B).



**Figura 20. Análisis de los marcadores de activación de las HSC tras la estimulación con IGF1.** **A.** Imágenes representativas de microfotografías de contraste de fases (10X). **B.** (panel izqdo.) Imágenes representativas de la inmunofluorescencia de αSMA y COL1. (panel dcho.) Cuantificación de la inmunofluorescencia. Los datos están expresados como número de veces de aumento con respecto a las células sin estimular y están representados como la media ± SEM. Tratamiento celular: células LX2 tratadas con IGF1 (10 nM) durante 24 horas, y sus correspondientes controles sin estimular.

\*  $p < 0.05$ , IGF1 vs. control. (n=5 experimentos independientes por duplicado).

Para analizar las vías de señalización activadas tras el tratamiento con IGF1, se estimularon células LX2 con IGF1 a la concentración de 10 nM durante 15 minutos y se analizó mediante Western Blot la fosforilación del IGF1R, AKT y ERK, encontrándose todas ellas elevadas en las células LX2 tratadas en comparación con los controles sin tratar (Figura 21A). Además, se analizó la expresión de la MMP9 mediante inmunofluorescencia ya que se trata de una metaloproteasa de matriz extracelular que se encuentra sobreexpresada tras la activación de las HSC y su expresión está regulada por las MAPK [149]. La cuantificación de estas inmunofluorescencias junto con las imágenes obtenidas mediante microscopía confocal reveló que la expresión de la MMP9 fue mucho más elevada en las células LX2 tratadas con IGF1 a la concentración 10 nM durante 24 horas comparadas con las células control (Figura 21B).



**Figura 21. Análisis de las vías de señalización implicadas en la activación de las HSC tras la estimulación con IGF1. A. (panel izqdo.)**

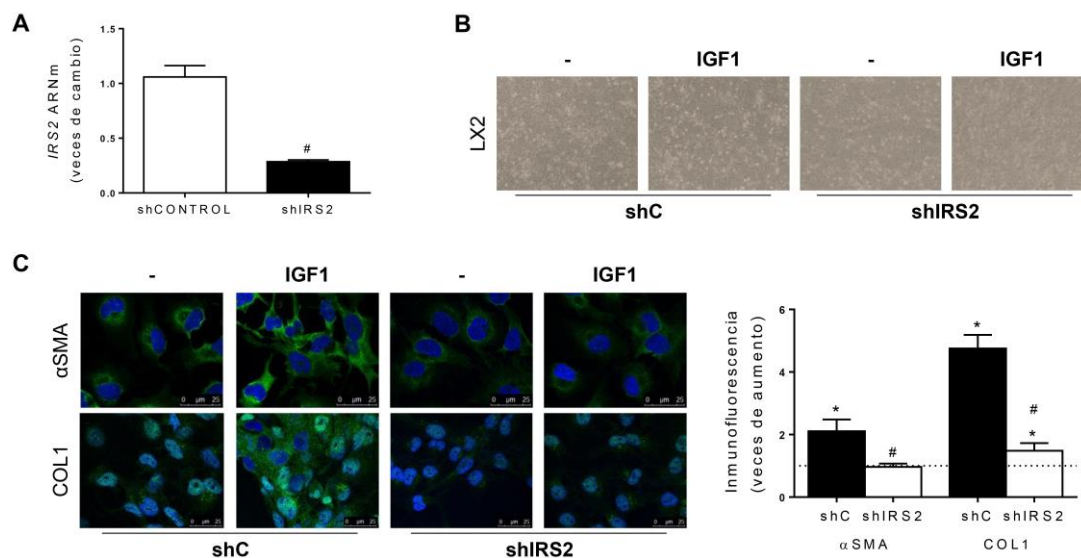
Western Blot representativo que muestra los niveles de pIGF1R, pAKT y pERK. (panel dcho.) Cuantificación de los blots. Los datos están expresados como porcentaje de estimulación con respecto a las células sin estimular y están representados como la media  $\pm$  SEM. **B. (panel izqdo.)** Imágenes representativas de la inmunofluorescencia de MMP9. (panel dcho.) Cuantificación de la inmunofluorescencia. Los datos están expresados como número de veces de aumento con respecto a las células sin estimular y están representados como la media  $\pm$  SEM. Tratamiento celular: células LX2 tratadas con IGF1 (10 nM) durante 15 minutos (A) o 24 horas (B), y sus correspondientes controles sin estimular.

\*  $p < 0.05$ , IGF1 vs. control. (n=3-5 experimentos independientes por duplicado).

#### 4.2.2 El silenciamiento de IRS2 en la línea celular LX2 revierte la activación y diferenciación de las HSC hacia miofibroblastos inducidas por el IGF1.

Una vez definidas las condiciones experimentales para el tratamiento de las células LX2 con IGF1, el siguiente objetivo consistió en conseguir el silenciamiento del gen *IRS2* y, así, analizar los marcadores de activación en esta línea celular. Para ello, se realizó una transfección estable con partículas lentivirales control (shControl) o con partículas lentivirales shRNA *IRS2* (sh*IRS2*) obteniendo un 80% de silenciamiento para el gen *IRS2* tras el análisis realizado mediante RT-qPCR (Figura 22A). A continuación, se repitió el experimento anteriormente descrito, estimulando las células

shControl y shIRS2 con IGF1 a una concentración de 10 nM durante 24 horas y llevando en paralelo los controles correspondientes sin estimular. Las imágenes de microscopía de contraste de fases revelaron que las células shControl estimuladas con IGF1 mostraron características morfológicas de HSC activadas y un fenotipo miofibroblástico comparado con las células shControl que no habían sido estimuladas. Sin embargo, las células LX2 shIRS2 estimuladas con IGF1 en las mismas condiciones mantuvieron un fenotipo quiescente semejante a las células control sin estimular (Figura 22B). El análisis mediante inmunofluorescencia de los niveles  $\alpha$ SMA y COL1 mostró que las células shControl estimuladas con IGF1 expresaron de manera mucho más elevada ambas proteínas en comparación a las células shIRS2 estimuladas con la misma dosis de IGF1 y durante el mismo tiempo (Figura 22C).



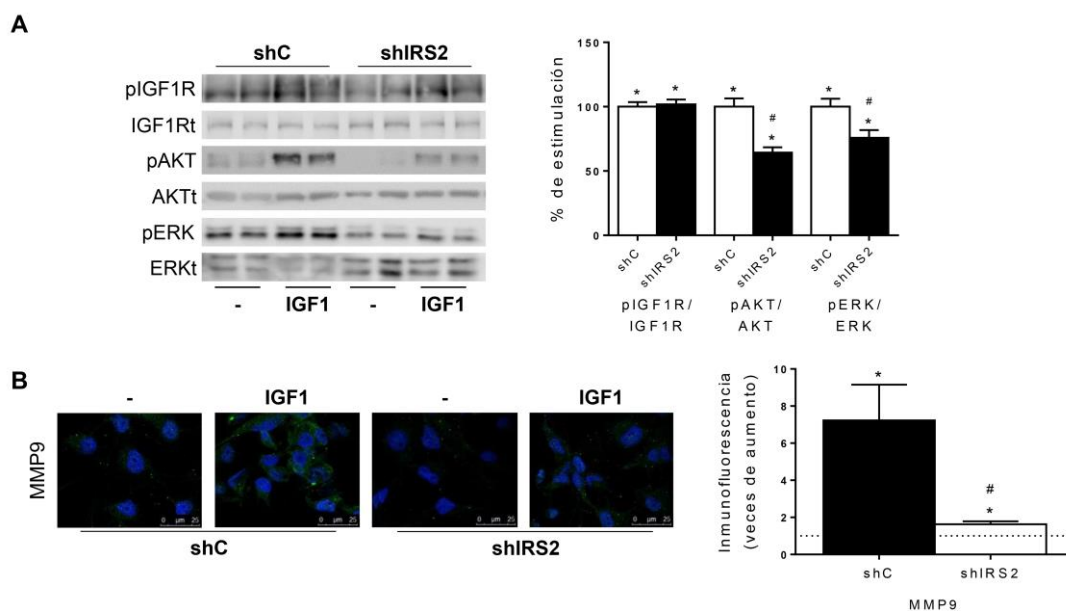
**Figura 22. Análisis de los marcadores de activación de las HSC inducida por IGF1 en células silenciadas para el gen IRS2.** **A.** Determinación mediante RT-qPCR de los niveles de mRNA de *IRS2*. Los datos están expresados como número de veces de cambio con respecto a las células control (shC). **B.** Imágenes representativas de microfotografías de contraste de fases (10X). **C.** (panel izqdo.) Imágenes representativas de la inmunofluorescencia de  $\alpha$ SMA y COL1. (panel dcho.) Cuantificación de la inmunofluorescencia. Los datos están expresados como número de veces de aumento con respecto a las células sin estimular y están representados como la media  $\pm$  SEM. Tratamiento celular: células LX2



transfectadas con partículas lentivirales control (shControl) o con partículas lentivirales para el silenciamiento de IRS2 (shIRS2), y tratadas con IGF1 (10 nM) durante 24 horas, y sus correspondientes controles sin estimular.

\*  $p < 0.05$ , IGF1 vs. control. (n= 3 experimentos independientes por duplicado).

La siguiente aproximación fue analizar la implicación del IRS2 en la señalización que regula la activación de las HSC inducida por IGF1 a través de la vía de las MAPK. Para ello se utilizaron las líneas celulares LX2 shControl y shIRS2 que se estimularon con IGF1 (10 nM) durante 15 minutos. El análisis realizado mediante por Western Blot mostró que mientras que no se encontraron diferencias en los niveles de fosforilación del IGF1R entre las células shControl y las células shIRS2 estimuladas con IGF1, la fosforilación de AKT y de ERK fue mucho menor en estas últimas (Figura 23A). Por otro lado, se estudió la expresión proteica de la MMP9 mediante inmunofluorescencia en ambos tipos de células. Los resultados mostraron que el aumento significativo de la expresión de MMP9 encontrado en las células shControl estimuladas con IGF1 con respecto a las células shControl sin estimular no se apreció en las células shIRS2 estimuladas en las mismas condiciones (Figura 23B).



**Figura 23. Análisis de las vías de señalización implicadas en la activación de las HSC inducida por IGF1 en células silenciadas para el gen IRS2.** A. (panel izqdo.) Western Blot representativo que muestra los niveles de pIGF1R, pAKT y pERK. (panel dcho.) Cuantificación de los blots. Los datos están expresados como porcentaje de estimulación con respecto a las células shControl sin estimular y están representados como

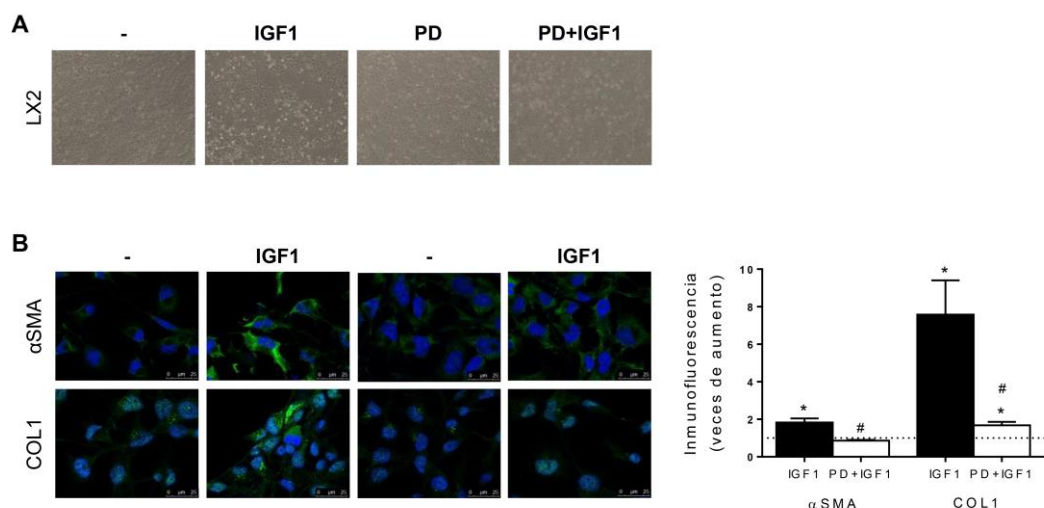
la media  $\pm$  SEM. **B.** (*panel izqdo.*) Imágenes representativas de la inmunofluorescencia de MMP9. (*panel dcho.*) Cuantificación de la inmunofluorescencia. Los datos están expresados como número de veces de aumento con respecto a las células control sin estimular y están representados como la media  $\pm$  SEM. Tratamiento celular: células LX2 transfectadas con partículas lentivirales control (shControl) o con partículas lentivirales para el silenciamiento de IRS2 (shIRS2), y tratadas con IGF1 (10 nM) durante 15 minutos (A) o 24 horas (B), y sus correspondientes controles sin estimular.

\*  $p < 0.05$ , IGF1 vs. control; #  $p < 0.05$ , shIRS2 vs. shC. (n= 3 experimentos independientes por duplicado).

Los resultados obtenidos en los experimentos realizados en la línea celular LX2 con silenciamiento del gen *IRS2* sugieren que la ausencia de esta proteína de la familia IRS impide la activación de las HSC inducida por la acción del IGF1.

#### **4.2.3 El bloqueo de la ruta de señalización mediada por ERK inhibe la activación de las HSC inducida por el IGF1.**

La última aproximación experimental que se realizó fue el análisis de la implicación de la vía IGF1R-ERK1/2-MMP9 en la activación de las HSC. Para ello, las células LX2 se pretrataron con PD98059, un inhibidor farmacológico de MEK, proteína quinasa responsable de la activación de ERK1/2, durante 2 horas y, posteriormente, se estimularon dichas células con IGF1 (10 nM) durante 24 horas. En las imágenes tomadas mediante contraste de fases al finalizar el tratamiento se observó que tal como ocurría en experimentos anteriores, las células que recibieron el estímulo del IGF1 en ausencia del inhibidor mostraron características morfológicas de HSC activadas en comparación con las células control sin estimular. Sin embargo, las células que fueron pretratadas durante 2 horas con el inhibidor de MEK no mostraron ningún fenotipo de activación 24 horas después de la estimulación con IGF1 (Figura 24A). Asimismo, se realizó el análisis mediante inmunofluorescencia de la expresión de  $\alpha$ SMA y COL1, y el aumento de los niveles de estas proteínas tras la estimulación con IGF1 no se observó en las células que fueron pretratadas con el inhibidor PD98059 (Figura 24B).

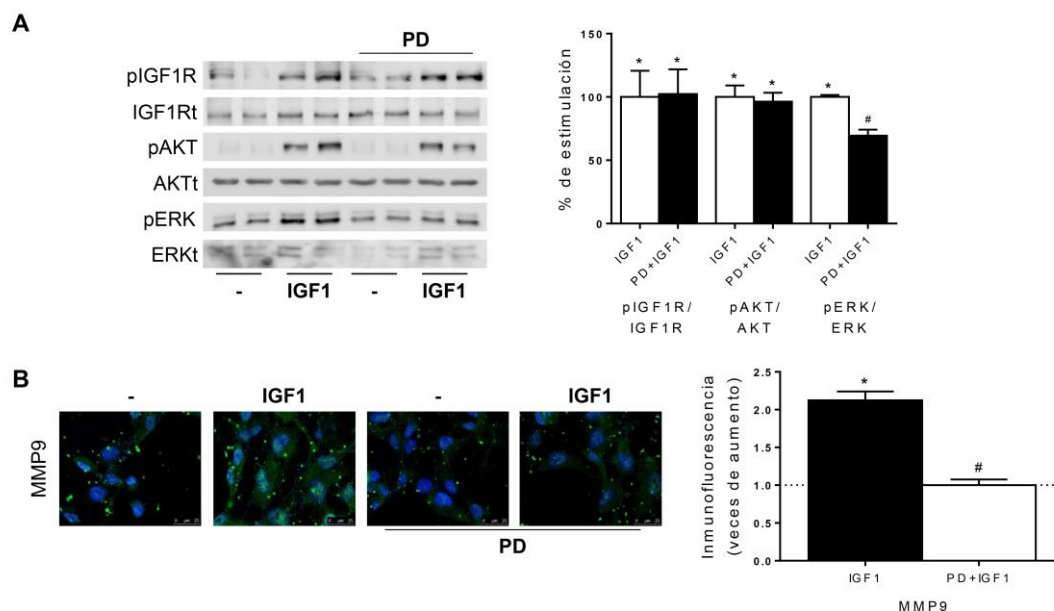


**Figura 24. Análisis de los marcadores de activación de las HSC inducida por IGF1 en presencia del inhibidor farmacológico de MEK, PD98059.** **A.** Imágenes representativas de microfotografías de contraste de fases (10X). **B.** (panel izqdo.) Imágenes representativas de la inmunofluorescencia de  $\alpha$ SMA y COL1. (panel dcho.) Cuantificación de la inmunofluorescencia. Los datos están expresados como número de veces de aumento con respecto a las células sin estimular y están representados como la media  $\pm$  SEM. Tratamiento celular: células LX2 pretratadas con PD98059 (20  $\mu$ M) durante 2 horas y tratadas con IGF1 (10 nM) durante 24 horas, y sus correspondientes controles sin estimular.

\*  $p < 0.05$ , IGF1 vs. control; #  $p < 0.05$ , PD vs. células sin pretratar (n= 3 experimentos independientes por duplicado).

A continuación, se estudió la activación de la vía de señalización IGF1R-ERK1/2-MMP9 en las células LX2 pretratadas con el inhibidor farmacológico de MEK y estimuladas con IGF1 durante 15 minutos. El análisis realizado mediante Western Blot de la fosforilación del IGF1R mostró que tanto las células LX2 estimuladas con IGF1 durante 15 minutos pretratadas o sin pretratar con el PD98059 (20  $\mu$ M) durante 2 horas presentaron un aumento en la fosforilación del IGF1R, indicando una correcta estimulación y activación del receptor IGF1R por su ligando. Además, no se detectaron diferencias en cuanto a la fosforilación de AKT mientras que en las células que habían sido pretratadas con el PD98059 no observó la fosforilación de ERK1/2 en comparación con sus controles sin pretratar, lo que indica que la inhibición farmacológica de ERK1/2 inducida por PD98059 es muy selectiva (Figura 25A). Por último, se realizó el análisis mediante inmunofluorescencia de la expresión de la

metaloproteasa MMP9 y se comprobó tanto en las fotografías de microscopía confocal como en su correspondiente cuantificación que las células LX2 que fueron pretratadas con el inhibidor farmacológico de MEK y estimuladas con IGF1 durante 24 horas no presentaron un aumento en la expresión de la MMP9 con respecto a sus controles sin estimular, aumento que sí se observó en las células LX2 que no fueron pretratadas con dicho inhibidor (Figura 25B).



**Figura 25. Análisis de las vías de señalización implicadas en la activación de las HSC inducida por IGF1 en presencia del inhibidor farmacológico de MEK, PD98059. A. (panel izqdo.)** Western Blot representativo que muestra los niveles de pIGF1R, pAKT y pERK. **(panel dcho.)** Cuantificación de los blots. Los datos están expresados como porcentaje de estimulación con respecto a las células sin estimular y están representados como la media  $\pm$  SEM. **B. (panel izqdo.)** Imágenes representativas de la inmunofluorescencia de MMP9. **(panel dcho.)** Cuantificación de la inmunofluorescencia. Los datos están expresados como número de veces de aumento con respecto a las células sin estimular y están representados como la media  $\pm$  SEM. Tratamiento celular: células LX2 pretratadas con PD98059 (20  $\mu$ M) durante 2 horas y tratadas con IGF1 (10 nM) durante 15 minutos (A) o 24 horas (B), y sus correspondientes controles sin estimular.

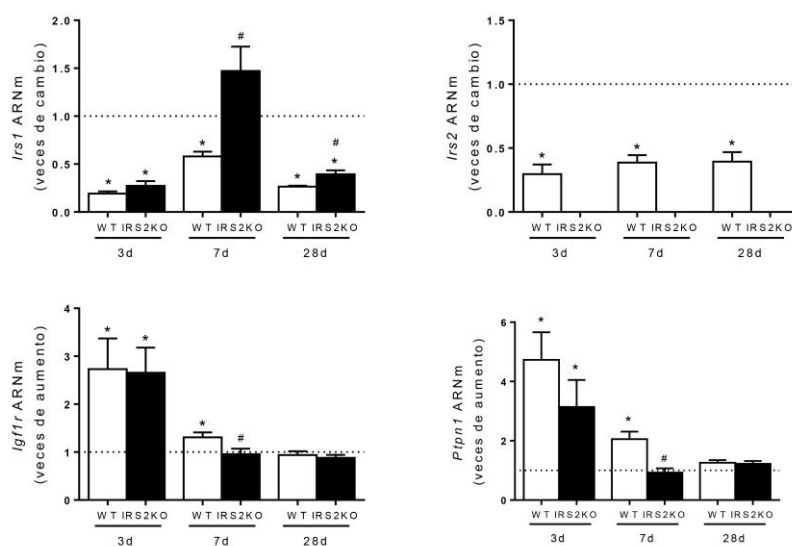
\*  $p < 0.05$ , IGF1 vs. control; #  $p < 0.05$ , PD vs. células sin pretratar ( $n = 3$  experimentos independientes por duplicado).

Estos resultados indican que la inhibición de la vía de ERK reduce la activación de las HSC en respuesta a IGF1, al menos en parte porque impide la inducción de la metaloproteasa MMP9.

### 4.3 La ausencia de IRS2 modifica la expresión génica de IRS1 y MMP9 en ratones sometidos a BDL.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos in vitro que han establecido una conexión entre la señalización mediada por el IGF1 vía ERK1/2 y la expresión de la MMP9, analizamos la expresión de las proteínas clave en la vía de señalización de IGF1 en los hígados de los ratones WT e IRS2KO a los que se les había sometido a la BDL y se sacrificaron a los 3, 7 y 28 días después de la cirugía. El objetivo de este estudio fue determinar si esta vía de señalización se encuentra alterada en los hígados en el modelo experimental murino de fibrosis hepática.

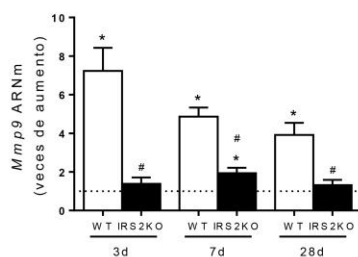
El análisis mediante RT-qPCR reveló que a los 3 días después de la cirugía, los hígados de los ratones WT e IRS2KO presentaron un aumento significativo en la expresión génica del *Igf1r* en ambos genotipos (Figura 26). En tiempos posteriores se observó que los niveles del mRNA del *Igf1r* se normalizaron, retornando a la situación basal a los 28 días después de la cirugía en los ratones WT y a los 7 días post-cirugía en los ratones IRS2KO. El análisis de la expresión génica de *Ptpn1*, el principal regulador negativo y responsable de la defosforilación del IGF1R [137], mostró un patrón de modulación tras la BDL similar al de *Igf1r*. Por otro lado, la expresión tanto del *Irs1* como de *Irs2* se encontró disminuida de manera muy significativa en los ratones WT operados en los 3 tiempos después de la cirugía analizados en comparación con los ratones WT no sometidos a la BDL (sham). No obstante, los ratones IRS2KO presentaron la disminución en la expresión del gen *Irs1* en el tiempo inicial de 3 días, pero, curiosamente, a los 7 días post-BDL se observó un aumento muy significativo en la expresión génica del *Irs1* en los hígados de estos ratones en comparación con sus controles (sham) y con los ratones WT operados. Además, a los 28 días después de la BDL los niveles de expresión génica de *Irs1* en los ratones IRS2KO continuaron elevados de manera significativa en comparación con los ratones WT operados, aunque en una proporción menor que los encontrados a los 7 días (Figura 26).



**Figura 26. Análisis de expresión génica de los mediadores de la vía de señalización del IGF1 en los hígados procedentes de ratones WT e IRS2KO sometidos a la BDL.** Determinación mediante RT-qPCR de los niveles del mRNA del sustrato del receptor de la insulina tipo 1 (*Irs1*), del sustrato del receptor de la insulina tipo 2 (*Irs2*), del receptor del IGF1 (*Igf1r*) y de la proteína tirosina fosfatasa 1b (*Ptpn1*). Los datos están expresados como número de veces de aumento con respecto a los ratones control (sham) y están representados como la media  $\pm$  SEM. Grupo experimental: ratones de genotipo salvaje (WT) y deficientes en el gen *Irs2* (IRSKO) sometidos a la BDL durante 3, 7 y 28 días (BDL), y sus correspondientes controles (sham).

\*  $p < 0.05$ , BDL vs. sham; #  $p < 0.05$ , IRS2KO vs. WT. (n= 6-12 animales por condición).

Finalmente, el análisis mediante RT-qPCR de los ratones WT e IRS2KO sometidos a BDL durante 3, 7 y 28 días reveló que los ratones WT aumentaron de manera significativa los niveles hepáticos de expresión *Mmp9* en los 3 tiempos analizados después de la cirugía, mientras que en los ratones IRS2KO operados únicamente aumentaron de manera significativa a los 7 días post-BDL y, además, de manera mucho menos pronunciada que en los ratones WT (Figura 27).



**Figura 27. Análisis de la expresión génica de *Mmp9* en los hígados procedentes de ratones WT e IRS2KO sometidos a la BDL.**

Determinación mediante RT-qPCR de los niveles de mRNA de la metaloproteínasa de matriz (*Mmp9*). Los datos están expresados como veces de aumento con respecto a los ratones control (sham) y están representados como la media  $\pm$  SEM. Grupo experimental: ratones de genotipo salvaje (WT) y deficientes en el gen *Irs2* (IRSKO) sometidos a la BDL durante 3, 7 y 28 días (BDL), y sus correspondientes controles (sham).

\*  $p < 0.05$ , BDL vs. sham; #  $p < 0.05$ , IRS2KO vs. WT. (n= 6-12 animales por condición).

Estos resultados indican que la ausencia de IRS2 podría afectar a la señalización mediada por el IGF1R, afectando a la expresión de MMP9.



## **5. DISCUSIÓN**

La fibrosis hepática ocurre como un proceso de cicatrización en respuesta al daño hepático subyacente a enfermedades crónicas del hígado de diversa etiopatología como el consumo excesivo de alcohol, infección por el virus de la hepatitis, la esteatosis, la resistencia a la insulina, así como por procesos colestásicos. El proceso fibrótico se inicia con una respuesta inflamatoria con el fin de compensar y resolver el daño subyacente. Sin embargo, cuando la inflamación no puede ser resuelta porque el daño no remite, la respuesta inflamatoria desencadena un proceso fibrogénico que implica una alteración en la composición y distribución de la ECM en el hígado, todo ello provocado por la activación de las HSC [33-35].

IRS2 es una molécula clave en la vía de señalización que media la acción de la insulina ya que los ratones deficientes en el gen *Irs2* presentan hiperglucemia en el ayuno, resistencia sistémica a la insulina, intolerancia a la glucosa, disfunción de las células  $\beta$  pancreáticas; en resumen, procesos que desencadenan una DM2 muy severa en los machos y un estado prediabético en las hembras manifestándose por tanto un dimorfismo sexual [127]. De hecho, estudios previos de nuestro laboratorio demostraron que a nivel hepático estos ratones desarrollan una profunda resistencia a la insulina perdiendo la capacidad para inducir la síntesis de glucógeno, así como para inhibir la gluconeogénesis en respuesta a la hormona [139]. Asimismo, los hepatocitos inmortalizados deficientes en el gen *Irs2* pierden la respuesta a la insulina en relación con el rescate de la apoptosis inducida tras la retirada de factores tróficos del medio de cultivo [132]. Estos resultados, junto con los trabajos aportados por otros laboratorios, sugieren que además de regular las acciones metabólicas de la insulina, el IRS2 está implicado en otros procesos celulares como el balance de muerte celular/supervivencia en los hepatocitos. Sin embargo, el papel del IRS2 en otros procesos fisiopatológicos en el hígado apenas ha sido estudiado. Por ello, en el presente trabajo se ha estudiado el impacto de la deficiencia del gen *Irs2* en la aparición y desarrollo del proceso fibrótico asociado al daño biliar en el hígado.

Para llevar a cabo este estudio se han utilizado ratones hembras deficientes en el gen *Irs2* debido a que, tal como se ha señalado anteriormente y detallado en la sección de introducción, presentan un fenotipo metabólico prediabético mucho más moderado que los ratones machos. Como modelo preclínico de enfermedad utilizamos la ligadura del ducto biliar, cirugía ampliamente utilizada para inducir daño colestásico en el hígado. Este modelo es capaz de reproducir las principales características histológicas del proceso fibrótico que ocurre en los humanos, incluyendo inflamación, regeneración y acumulación de fibras de colágeno, desarrollándose una fibrosis completa a los 28 días después de la cirugía [45].

Los resultados obtenidos revelaron un retraso en la aparición y progresión del proceso fibrótico asociado a daño biliar en el hígado de los animales IRS2KO sometidos a la cirugía de BDL en comparación con sus correspondientes controles de genotipo WT. El análisis histológico de las muestras de los hígados de los ratones sacrificados a diferentes tiempos tras la BDL reveló que la ausencia de IRS2 conducía a un descenso en el grado de fibrosis a los 3 y 7 días. Sin embargo, tras 28 días post-BDL, momento en el que la fibrosis está completamente establecida en este modelo experimental, los marcadores de dicho proceso fueron semejantes en ambos genotipos. En esta misma línea, los principales indicadores bioquímicos de daño hepático y biliar, bilirrubina y fosfatasa alcalina, se encontraron disminuidos significativamente a los 3 y 7 días post-BDL en los ratones IRS2KO frente a los ratones WT. Sin embargo, los niveles de bilirrubina total fueron comparables en ambos genotipos a los 28 días post-BDL en paralelo con el análisis histológico de los hígados en este tiempo final. Cabe destacar que el marcador bioquímico fosfatasa alcalina se mantuvo disminuido en los ratones IRS2KO a los 28 días, sugiriendo que, aunque sin diferencias en el grado de fibrosis, el daño biliar en los ratones IRS2KO era inferior que el de los ratones de genotipo salvaje en el tiempo final del experimento.

El análisis de la expresión génica de los principales marcadores fibrogénicos apoyó los resultados obtenidos a nivel histológico y bioquímico puesto que en todos los tiempos analizados después de la cirugía, los ratones IRS2KO presentaron una disminución en la expresión génica de *Serpine1*, gen que codifica para proteína inhibidor del activador del plasminógeno (PAI1), que en niveles elevados contribuye a la excesiva acumulación de fibras de colágeno y otras proteínas de la ECM [150], así como de *Tgfb1*, principal inductor del proceso fibrogénico implicado en la activación de las HSC [151]. Además, los niveles de expresión génica de *Col1a1* y *Acta2*, marcadores de activación de las HSC [152], apoyaron los resultados anteriores puesto que la expresión de *Col1a1* se redujo significativamente en ratones IRS2KO a los 7 días después de la cirugía y la de *Acta2* mostró este descenso a los 3 y 7 días, indicando que el retraso en el desarrollo del proceso fibrótico podría deberse a una menor activación de las HSC.

De la misma manera, la respuesta inflamatoria desencadenada en respuesta al daño hepático colestásico se retrasó en el tiempo en los ratones IRS2KO sometidos a BDL ya que sus hígados no presentaron un aumento significativo de las principales citoquinas proinflamatorias (IL1 $\beta$ , IL6 y TNF $\alpha$ ) en los primeros días después de la cirugía.

Por otra parte, aunque no se observaron diferencias en los niveles totales de ácidos biliares acumulados en el líquido de la vesícula biliar a los 28 días después de la BDL,

el análisis realizado por técnicas metabolómicas reveló diferencias en el perfil de su composición destacando principalmente el descenso significativo de los niveles de ácido quenodeoxicólico (CDC), ácido biliar altamente citotóxico por su gran hidrofobicidad [21], en los ratones IRS2KO operados. Curiosamente, estudios previos revelaron que el CDC es capaz de activar el sistema inflamósoma provocando mayores niveles de la citoquina proinflamatoria IL1 $\beta$  [153], lo que podría explicar los bajos niveles de esta citoquina que encontramos en los hígados de los ratones IRS2KO a los 7 y 28 días post-BDL. Por otro lado, se detectó un descenso significativo en los niveles de ácido taurolitocólico (TLC) en estos ratones. El TLC es el ácido biliar con mayor capacidad de generación de estrés oxidativo en el hígado [154, 155], hecho que se evidencia por los bajos niveles de expresión génica de Hmox1, gen que codifica para la hemoxigenasa que tiene un papel clave en la respuesta antioxidante, en los 3 tiempos analizados post-BDL en los ratones IRS2KO en comparación con los ratones de genotipo WT. De hecho, este perfil menos proinflamatorio de la composición de los ácidos biliares acumulados tras la BDL en la vesícula biliar del ratón IRS2KO podría explicar en parte que el componente inflamatorio asociado al proceso fibrótico en estas condiciones se encuentre disminuido.

En base a los resultados obtenidos, se plantearon los posibles mecanismos moleculares que podrían estar implicados en el retraso en la aparición y desarrollo de fibrosis inducida por daño colestásico en los ratones IRS2KO. Por un lado, el IRS2 es una molécula fundamental en la vía de señalización mediada por los receptores de insulina e IGF1 y, por otro, se ha postulado que el IGF1 tiene un papel importante en el proceso fibrogénico [156], así que decidimos explorar si las alteraciones en la modulación de la señalización del sistema IGF1/IGF1R debidas a la ausencia del IRS2 pudieran explicar, al menos en parte, el fenotipo encontrado.

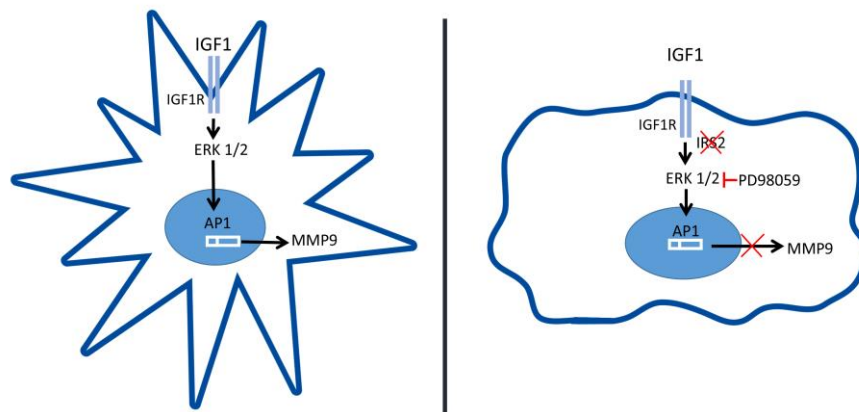
De acuerdo con esta hipótesis, un estudio previo había demostrado que la falta del IGF1R en las células hepáticas disminuye el daño hepatocelular a los 3 días después de someter a los ratones a BDL, proceso que fue monitorizado por una disminución en los marcadores de daño hepático en suero, en el área de las zonas infartadas en el tejido hepático y en los niveles de expresión génica de los marcadores fibrogénicos en el hígado [157]. Curiosamente, al igual que ocurre en el modelo deficiente en IRS2 estudiado en esta Tesis Doctoral, las diferencias entre ambos genotipos desaparecen a tiempos más tardíos después de la BDL, tiempos en los cuales la fibrosis ya se encuentra establecida. Estos resultados sugieren que una disminución en la señalización regulada por el sistema IGF1/IGF1R bien por deficiencias en el IGF1R o en IRS2, conlleva un retraso en la aparición de los síntomas asociados al proceso fibrótico inducido por daño colestásico.

A la vista de los resultados obtenidos en el modelo animal nos planteamos si los efectos encontrados podrían deberse a cambios en la capacidad del IGF1 para activar las HSC [156]. En la literatura existen controversias en relación a este tema. Por un lado, se ha demostrado que el IGF1 actúa sobre las HSC y suprime su activación, causando la senescencia celular y previniendo la fibrosis [158]. En contraposición, existen otros estudios que otorgan al IGF1 un papel profibrogénico y lo relacionan con la activación de las HSC. De hecho, en cultivos primarios y en líneas celulares de HSC, el IGF1 aumenta su proliferación [159] y favorece la expresión de colágeno [156]. En este sentido, observamos que las HSC procedentes de la línea celular de origen humano LX2 mostraron un fenotipo fibroblástico de activación tras la estimulación con IGF1 con respecto a las células que no recibieron estímulo, además de expresar los marcadores de activación COL1 y  $\alpha$ SMA. A nivel molecular, la capacidad del IGF1 de inducir la fosforilación de ERK1/2 podría explicar el aumento en la síntesis del colágeno ya que un estudio previo demostró que el IGF1 es capaz de aumentar los niveles de expresión colágeno en las HSC y este efecto es revertido por el inhibidor de MEK, proteína quinasa que fosforila y activa a ERK1/2, PD98059 [156]. Curiosamente, este trabajo reveló que la insulina induce la proliferación de las HSC pero no favorece la síntesis de colágeno. La capacidad del IGF1 para inducir la fosforilación de ERK1/2, efecto que la insulina no consigue en estas células, podría explicar el diferente comportamiento de estas hormonas sobre la activación de las HSC [156]. De hecho, en el modelo celular LX2 empleado en nuestro trabajo también se observó que la insulina no activaba de dichas células (resultado no mostrado) y, en concordancia con el estudio anteriormente mencionado, el IGF1 fue capaz de inducir la fosforilación de IGF1R y ERK1/2. Además, el pretratamiento de estas células con el inhibidor PD98059 bloqueó la fosforilación de ERK1/2, pero no la del IGF1R, y con ello se impidió la activación de las HSC tras la estimulación con IGF1, hecho que se evidenció por la ausencia del aumento en los niveles de expresión proteica de COL1 y  $\alpha$ SMA en las células pretratadas con el inhibidor. Asimismo, se observó mediante la visualización al microscopio un estado quiescente en las células pretratadas con el inhibidor y estimuladas con IGF1 en comparación con las células que no recibieron inhibidor y fueron estimuladas con IGF1 en las que sí que se observó la adquisición de un fenotipo fibroblástico como ya se ha comentado.

En relación con la activación de ERK1/2, se sabe que la vía de señalización de las MAPK aumenta la expresión de la metaloproteinasa de matriz extracelular MMP9 [149]. La MMP9 está implicada en la degradación de la matriz extracelular en condiciones basales [47]. En diversos estudios se ha observado como los niveles de esta proteína aumentaron en el proceso fibrogénico del hígado tanto en humanos

como en modelos animales [160]. La región del promotor del gen que codifica para la expresión de MMP9 contiene dominios de unión a AP1 [161], lo que implica un papel crucial de la ruta de las MAPK en la regulación de su expresión génica. Varios estudios en diferentes tipos celulares, incluidas las HSC, han sugerido un papel fundamental de ERK1/2 en la activación de la MMP9 [162]. En este sentido, al analizar la expresión proteica de la MMP9 mediante inmunofluorescencia en las células LX2 tratadas con IGF1 se observó un aumento significativo, que fue revertido en presencia del inhibidor PD98059, indicando la implicación de ERK1/2 en la inducción de la expresión de la MMP9.

Una vez establecida la importancia de la activación de ERK1/2 en la ruta de señalización mediada por el sistema IGF1-IGF1R que conduce a la activación de las HSC, se estudió el papel del IRS2 en este proceso. Para ello, se silenció el gen de *IRS2* mediante transfección estable en la línea celular LX2. La falta de IRS2 en estas células impidió la adquisición del fenotipo fibroblástico característico tras el tratamiento con el IGF1 y disminuyó de manera significativa la expresión de los marcadores de activación de las HSC. Además, el análisis de la vía de señalización mediada por el IGF1R reveló que la fosforilación de las dos dianas clave de la vía de señalización mediada por este receptor, ERK1/2 y AKT, se encontraba disminuida en las células tras el silenciamiento de *IRS2* en comparación con las células control. De igual manera, la expresión de MMP9 inducida por IGF1 fue menor en las células LX2 deficientes en *IRS2*, tal como se refleja en la Figura 28, sugiriendo que el IRS2 es un componente clave de la vía de señalización IGF1R-ERK1/2-MMP9 que conduce a la activación de las HSC en respuesta al IGF1.



**Figura 28: El bloqueo de la ruta de señalización IGF1-IGF1R por ausencia de IRS2 o inhibición de ERK1/2 impide la activación de HSC inducida por el IGF1.** La ausencia de IRS2 en las células estelares hepáticas impide su activación ya que se bloquea la activación de las mismas mediada por la ruta IGF1/IGF1R.

Además de ERK1/2, AKT es una proteína fundamental en la señalización del IGF1R. Asimismo, se ha descrito que la ruta PI3K-AKT es importante en la activación de las HSC inducida por insulina y glucosa [163]. De hecho, un trabajo demostró que un bloqueo de esta ruta produce una inactivación de las HSC, favoreciendo su apoptosis [164]. Otro estudio plantea que AKT2, la isoforma de AKT que media las funciones metabólicas de la insulina en el hígado [165], es necesaria para la activación de las HSC en un modelo murino de fibrosis [166]. Sin embargo, el papel específico de AKT en la activación de HSC inducida por IGF1 no ha sido estudiado, lo que sería muy interesante para futuras investigaciones.

Los resultados encontrados en esta Tesis Doctoral están en concordancia con varios estudios realizados en el modelo murino deficiente en el gen *Irs2* que revelan que es un componente fundamental en la vía de señalización mediada por el IGF1R en distintos tipos celulares. Entre ellos, se ha descrito el papel clave del IRS2 en la regulación de la vía de señalización del IGF1 que controla el crecimiento y la supervivencia de las células  $\beta$  pancreáticas [74]. Además, se sabe que el IRS2 también es capaz de coordinar la señalización de IGF1-IGF1R en el sistema nervioso central donde esta vía es esencial para el crecimiento del cerebro durante el desarrollo de los ratones [148]. Asimismo, se ha estudiado el papel del IRS2 y su implicación en la señalización mediada por el IGF1R en las retinas de los ratones IRS2KO, cuya vía de señalización se encuentra alterada a nivel de la AKT [167, 168].

Teniendo en cuenta los trabajos anteriormente mencionados, en esta Tesis Doctoral se analizaron los niveles de expresión de los componentes de la señalización mediada por el IGF1R en el modelo experimental de colestasis hepática encontrando que la expresión génica del *Igf1r* aumentó de manera significativa en el hígado de ambos genotipos en los primeros días tras la BDL, descendiendo a los niveles basales en tiempos más tardíos. Esta modulación en la expresión génica del *Igf1r* podría explicarse como un intento de compensar el aumento en la expresión del gen *Ptpn1*, conocido modulador negativo de esta ruta de señalización, que se observó en paralelo. Además, los niveles de expresión génica de *Irs1* e *Irs2* en los ratones WT sometidos a la BDL disminuyeron en todos los tiempos analizados tras la cirugía. Sin embargo, en el hígado de los ratones IRS2KO se observó un aumento en la expresión génica del *Irs1* a los 7 días post-cirugía. Este resultado podría ser debido a que en un primer momento (3 días post-BDL) estos ratones mostraron un aumento significativo en los niveles séricos de GOT con respecto a los niveles de los ratones WT, lo que podría indicar un mayor daño hepatocelular que sería probablemente compensado por un aumento de *Irs1* para sí mantener la señalización vía IGF1R que es fundamental en los procesos de reparación y supervivencia celular.

Dentro de la familia de las proteínas IRS, el IRS1 y el IRS2 se expresan de manera ubicua en todos los tejidos periféricos diana de la insulina e IGF1 [98], así como en ciertas regiones del sistema nervioso central responsables del control del balance energético del organismo [169]. Resulta intrigante el hecho de que siendo ambas moléculas mediadoras de las cascadas intracelulares desencadenadas tras la unión de la insulina o el IGF1 a sus respectivos receptores, la ausencia de uno de ellos origine alteraciones metabólicas y/o neurológicas severas. Entre los muchos ejemplos que han sido reportados sobre la especificidad de las proteínas IRS a nivel tisular podríamos destacar los trabajos pioneros publicados en la década de los años 90 por el laboratorio del Dr. Ronald C Kahn (Universidad de Harvard) demostrando que la deficiencia en IRS1 en el músculo esquelético y en el tejido adiposo blanco no era compensada por el IRS2 de manera que los ratones IRS1KO desarrollan una profunda resistencia a la insulina que no conducía a DMT2 debido al correcto mantenimiento de la respuesta proliferativa de las células beta pancreáticas que está mediada por la ruta IGF1R-IRS2 [121]. Trabajos posteriores de este mismo laboratorio demostraron que los adipocitos marrones deficientes en IRS1 perdían la capacidad de diferenciarse a un fenotipo termogénico maduro, así como la incapacidad de los adipocitos marrones deficientes en IRS2 de responder a la insulina en relación con el transporte de glucosa, lo que evidenciaba una especificidad celular en las acciones de las proteínas IRS en los adipocitos marrones [170]. En relación con el sistema nervioso central, la



resistencia a la insulina cerebral parece ser una característica temprana y común de la enfermedad de Alzheimer, un proceso acompañado de resistencia al IGF1 y estrechamente asociado con la disfunción de la señalización de ambas hormonas vía IRS1, lo que resulta en la acumulación de oligómeros de  $\beta$  amiloide que promueven el deterioro cognitivo [171].

Volviendo a la señalización mediada por el IGF1R en el modelo de colestasis hepática, aunque no se ha estudiado el grado de activación de esta ruta directamente, la deficiencia génica en *Irs2* *per se* y la menor inducción de los niveles de expresión génica de *Mmp9* en los ratones IRS2KO sometidos a BDL sugieren que en el hígado de estos ratones esta señalización se encuentra atenuada con respecto a los ratones WT, hecho que explicaría desde un punto de vista molecular el retraso en la aparición y desarrollo del proceso fibrótico desencadenado por la vía de señalización IGF1R-ERK1/2-MMP9 observado en ausencia de IRS2. De hecho, un estudio más exhaustivo sobre la activación de esta vía de señalización en este modelo de estudio sería muy interesante para futuras investigaciones.

Hace 10 años se planteó el tratamiento con IGF1 como una opción terapéutica para los pacientes con cirrosis hepática ya que estos pacientes muestran niveles circulantes de IGF1 muy bajos que están directamente relacionados con algunas de las complicaciones extrahepáticas fundamentalmente nutricionales y metabólicas (resistencia a insulina, desnutrición, osteopenia, hipogonadismo, alteraciones intestinales) asociadas a la cirrosis. De hecho, se ha demostrado la capacidad antifibrótica de la administración de IGF1 exógeno en ratones y humanos. En este sentido, un estudio ha demostrado que los parámetros histológicos en los animales con fibrosis hepática mejoran después de la administración de IGF1 [172]. En otros estudios se ha observado que la sobreexpresión de IGF1 en las HSC limitaba su activación, atenuaba la fibrosis y aceleraba la regeneración hepática en ratones cirróticos en el modelo experimental de inyección de  $\text{CCl}_4$  [173, 174]. Además, existen estudios donde se han encontrado bajas concentraciones séricas de IGF1 en pacientes con cirrosis hepática que se correlacionan con la progresión de la cirrosis hepática. En estos estudios, después del tratamiento con somatotropina, hormona capaz de aumentar los niveles de IGF1, la concentración sérica de IGF1 aumentó notablemente mejorando también la síntesis proteica [175-177]. El problema asociado a esta estrategia terapéutica es el riesgo potencial de administrar un factor de crecimiento en una condición preneoplásica como es la cirrosis. Por ello, se necesitan ensayos clínicos adicionales para identificar la dosis adecuada de IGF1, el tiempo y ritmo de administración, y el subgrupo de pacientes cirróticos que obtendrán mayor beneficio de este tratamiento sustitutivo.

El análisis conjunto de los resultados de esta Tesis Doctoral indica que el sistema IGF1-IGF1R y, concretamente, su vía de señalización mediada por el IRS2 vía ERK1/2 podría favorecer el daño producido en el hígado por ciertas patologías que desencadenan fibrosis hepática, incluyendo la colestasis, debido a una excesiva y/o sostenida activación de las HSC. Por ello, estos resultados deberían de ser tomados en consideración desde el punto de vista terapéutico a la hora de llevar a la clínica las terapias basadas en la administración de IGF1, indicando que es recomendable a la vez que necesario el diseño de nuevas estrategias terapéuticas en pacientes con cirrosis provocada por un proceso colestásico, y quizá también por otras patologías hepáticas que cursen con un proceso fibrótico.



## **6. CONCLUSIONES**

1. La deficiencia en el gen *Irs2* retrasa la aparición y desarrollo del proceso fibrótico en un modelo preclínico de colestasis biliar en ratones tanto desde el punto de vista histológico como bioquímico.
2. El aumento de expresión hepática de genes marcadores de inflamación y fibrosis se detecta en fases más tardías del proceso fibrótico, asociado al daño colestásico, en los ratones deficientes en el gen *Irs2*.
3. Ante el daño colestásico, los ratones deficientes en IRS2 presentan un perfil de ácidos biliares acumulados en la vesícula con mayores propiedades antioxidantes y citoprotectoras en relación con los controles de genotipo salvaje.
4. El IGF1 activa las células estelares hepáticas humanas LX2 mediante la inducción de la ruta IGF1R-ERK1/2-MMP9, resultando en una mayor expresión de marcadores de activación en estas células.
5. Tanto el silenciamiento del gen *IRS2* como el tratamiento farmacológico con el inhibidor de ERK1/2 impide el efecto proactivador del IGF1 sobre la activación de las células estelares hepáticas.
6. La falta de IRS2 protege de la inducción de la metaloproteasa MMP9 en el hígado tras el daño colestásico y este efecto está asociado, en parte, a la modulación de componentes esenciales de la señalización de IGF1R.

## **7. BIBLIOGRAFÍA**

1. Abdel-Misih, S.R. and M. Bloomston, *Liver anatomy*. Surg Clin North Am, 2010. **90**(4): p. 643-53.
2. Strazzabosco, M. and L. Fabris, *Functional anatomy of normal bile ducts*. Anat Rec (Hoboken), 2008. **291**(6): p. 653-60.
3. Jones, M.W. and S.S. Bhimji, *Anatomy, Abdomen, Gallbladder*, in StatPearls. 2018: Treasure Island (FL).
4. Boyer, J.L., *Bile formation and secretion*. Compr Physiol, 2013. **3**(3): p. 1035-78.
5. Chen, G., R. Cheung, and J.W. Tom, *Hepatitis: Sedation and Anesthesia Implications*. Anesth Prog. **64**(2): p. 106-118.
6. Chiang, J.Y., *Bile acids: regulation of synthesis*. J Lipid Res, 2009. **50**(10): p. 1955-66.
7. Werner, M., et al., *All-In-One: Advanced preparation of Human Parenchymal and Non-Parenchymal Liver Cells*. PLoS One, 2015. **10**(9): p. e0138655.
8. Tsutsui, H. and S. Nishiguchi, *Importance of Kupffer cells in the development of acute liver injuries in mice*. Int J Mol Sci, 2014. **15**(5): p. 7711-30.
9. Paumgartner, G. and U. Beuers, *Ursodeoxycholic acid in cholestatic liver disease: mechanisms of action and therapeutic use revisited*. Hepatology, 2002. **36**(3): p. 525-31.
10. Pusl, T. and U. Beuers, *Ursodeoxycholic acid treatment of vanishing bile duct syndromes*. World J Gastroenterol, 2006. **12**(22): p. 3487-95.
11. Molinaro, A., A. Wahlstrom, and H.U. Marschall, *Role of Bile Acids in Metabolic Control*. Trends Endocrinol Metab, 2018. **29**(1): p. 31-41.
12. Qi, Y., et al., *Bile acid signaling in lipid metabolism: metabolomic and lipidomic analysis of lipid and bile acid markers linked to anti-obesity and anti-diabetes in mice*. Biochim Biophys Acta, 2015. **1851**(1): p. 19-29.
13. Myant, N.B. and K.A. Mitropoulos, *Cholesterol 7 alpha-hydroxylase*. J Lipid Res, 1977. **18**(2): p. 135-53.
14. Bjorkhem, I., *Mechanism of degradation of the steroid side chain in the formation of bile acids*. J Lipid Res, 1992. **33**(4): p. 455-71.
15. Li, T. and J.Y. Chiang, *Regulation of bile acid and cholesterol metabolism by PPARs*. PPAR Res, 2009. **2009**: p. 501739.
16. Axelson, M. and J. Sjovall, *Potential bile acid precursors in plasma--possible indicators of biosynthetic pathways to cholic and chenodeoxycholic acids in man*. J Steroid Biochem, 1990. **36**(6): p. 631-40.
17. Axelson, M., B. Mork, and J. Sjovall, *Occurrence of 3 beta-hydroxy-5-cholestenoic acid, 3 beta,7 alpha-dihydroxy-5-cholestenoic acid, and 7 alpha-hydroxy-3-oxo-4-cholestenoic acid as normal constituents in human blood*. J Lipid Res, 1988. **29**(5): p. 629-41.
18. Pikuleva, I.A., et al., *Activities of recombinant human cytochrome P450c27 (CYP27) which produce intermediates of alternative bile acid biosynthetic pathways*. J Biol Chem, 1998. **273**(29): p. 18153-60.
19. Fickert, P. and M. Wagner, *Biliary bile acids in hepatobiliary injury - What is the link?* J Hepatol, 2017. **67**(3): p. 619-631.
20. Perez, M.J. and O. Briz, *Bile-acid-induced cell injury and protection*. World J Gastroenterol, 2009. **15**(14): p. 1677-89.
21. Modica, S., R.M. Gadaleta, and A. Moschetta, *Deciphering the nuclear bile acid receptor FXR paradigm*. Nucl Recept Signal, 2010. **8**: p. e005.
22. Thomas, C., et al., *Targeting bile-acid signalling for metabolic diseases*. Nat Rev Drug Discov, 2008. **7**(8): p. 678-93.
23. Attili, A.F., et al., *Bile acid-induced liver toxicity: relation to the hydrophobic-hydrophilic balance of bile acids*. Med Hypotheses, 1986. **19**(1): p. 57-69.

24. Spivey, J.R., S.F. Bronk, and G.J. Gores, *Glycochenodeoxycholate-induced lethal hepatocellular injury in rat hepatocytes. Role of ATP depletion and cytosolic free calcium*. J Clin Invest, 1993. **92**(1): p. 17-24.
25. Galle, P.R., et al., *Ursodeoxycholate reduces hepatotoxicity of bile salts in primary human hepatocytes*. Hepatology, 1990. **12**(3 Pt 1): p. 486-91.
26. Sokol, R.J., et al., *Vitamin E reduces oxidant injury to mitochondria and the hepatotoxicity of taurochenodeoxycholic acid in the rat*. Gastroenterology, 1998. **114**(1): p. 164-74.
27. Maher, J.J. and S.L. Friedman, *Parenchymal and nonparenchymal cell interactions in the liver*. Semin Liver Dis, 1993. **13**(1): p. 13-20.
28. Elias, E. and J.L. Boyer, *Mechanisms of intrahepatic cholestasis*. Prog Liver Dis, 1979. **6**: p. 457-70.
29. Kaplan, M.M. and M.E. Gershwin, *Primary biliary cirrhosis*. N Engl J Med, 2005. **353**(12): p. 1261-73.
30. Kaplan, M.M., in *Diseases of the liver*. 1993. p. 223-250.
31. Quiroga, J., *Bile salts, bile flow and cholestasis*, in *Hepatobiliary diseases*. 1992. p. 201-280.
32. Herrero Santos, J.I.P., J., *Ictericias*, in *Medicina Interna*. 1995. p. 280-288.
33. Lee, U.E. and S.L. Friedman, *Mechanisms of hepatic fibrogenesis*. Best Pract Res Clin Gastroenterol, 2011. **25**(2): p. 195-206.
34. Czaja, A.J., *Hepatic inflammation and progressive liver fibrosis in chronic liver disease*. World J Gastroenterol, 2014. **20**(10): p. 2515-32.
35. Koyama, Y. and D.A. Brenner, *Liver inflammation and fibrosis*. J Clin Invest, 2017. **127**(1): p. 55-64.
36. Bouwens, L., et al., *Quantitation, tissue distribution and proliferation kinetics of Kupffer cells in normal rat liver*. Hepatology, 1986. **6**(4): p. 718-22.
37. Seki, E., et al., *Lipopolysaccharide-induced IL-18 secretion from murine Kupffer cells independently of myeloid differentiation factor 88 that is critically involved in induction of production of IL-12 and IL-1beta*. J Immunol, 2001. **166**(4): p. 2651-7.
38. Mosser, D.M. and J.P. Edwards, *Exploring the full spectrum of macrophage activation*. Nat Rev Immunol, 2008. **8**(12): p. 958-69.
39. Zhang, F., et al., *TGF-beta induces M2-like macrophage polarization via SNAIL-mediated suppression of a pro-inflammatory phenotype*. Oncotarget, 2016. **7**(32): p. 52294-52306.
40. Ramachandran, P., et al., *Differential Ly-6C expression identifies the recruited macrophage phenotype, which orchestrates the regression of murine liver fibrosis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012. **109**(46): p. E3186-95.
41. McDonald, B., et al., *Interaction of CD44 and hyaluronan is the dominant mechanism for neutrophil sequestration in inflamed liver sinusoids*. J Exp Med, 2008. **205**(4): p. 915-27.
42. Meng, F., et al., *Interleukin-17 signaling in inflammatory, Kupffer cells, and hepatic stellate cells exacerbates liver fibrosis in mice*. Gastroenterology, 2012. **143**(3): p. 765-776 e3.
43. Bataller, R. and D.A. Brenner, *Liver fibrosis*. J Clin Invest, 2005. **115**(2): p. 209-18.
44. Blaner, W.S., et al., *Hepatic stellate cell lipid droplets: a specialized lipid droplet for retinoid storage*. Biochim Biophys Acta, 2009. **1791**(6): p. 467-73.
45. Tag, C.G., et al., *Bile duct ligation in mice: induction of inflammatory liver injury and fibrosis by obstructive cholestasis*. J Vis Exp, 2015(96).
46. Wang, H., Y. Zhang, and R.O. Heuckeroth, *PAI-1 deficiency reduces liver fibrosis after bile duct ligation in mice through activation of tPA*. FEBS Lett, 2007. **581**(16): p. 3098-104.
47. Duarte, S., et al., *Matrix metalloproteinases in liver injury, repair and fibrosis*. Matrix Biol, 2015. **44-46**: p. 147-56.



48. Moore, C., et al., *Fibronectin-alpha4beta1 integrin interactions regulate metalloproteinase-9 expression in steatotic liver ischemia and reperfusion injury*. Am J Pathol, 2007. **170**(2): p. 567-77.
49. Lichtinghagen, R., et al., *Expression pattern of matrix metalloproteinases in human liver*. Eur J Clin Chem Clin Biochem, 1995. **33**(2): p. 65-71.
50. Milani, S., et al., *Differential expression of matrix-metalloproteinase-1 and -2 genes in normal and fibrotic human liver*. Am J Pathol, 1994. **144**(3): p. 528-37.
51. Hamada, T., et al., *Metalloproteinase-9 deficiency protects against hepatic ischemia/reperfusion injury*. Hepatology, 2008. **47**(1): p. 186-98.
52. Kessenbrock, K., V. Plaks, and Z. Werb, *Matrix metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment*. Cell, 2010. **141**(1): p. 52-67.
53. Bourboulia, D. and W.G. Stetler-Stevenson, *Matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs): Positive and negative regulators in tumor cell adhesion*. Semin Cancer Biol, 2010. **20**(3): p. 161-8.
54. Parks, W.C., C.L. Wilson, and Y.S. Lopez-Boado, *Matrix metalloproteinases as modulators of inflammation and innate immunity*. Nat Rev Immunol, 2004. **4**(8): p. 617-29.
55. Sternlicht, M.D. and Z. Werb, *How matrix metalloproteinases regulate cell behavior*. Annu Rev Cell Dev Biol, 2001. **17**: p. 463-516.
56. Martinez-Hernandez, A., *The hepatic extracellular matrix. I. Electron immunohistochemical studies in normal rat liver*. Lab Invest, 1984. **51**(1): p. 57-74.
57. Martinez-Hernandez, A. and P.S. Amenta, *The extracellular matrix in hepatic regeneration*. FASEB J, 1995. **9**(14): p. 1401-10.
58. Hernandez-Gea, V. and S.L. Friedman, *Pathogenesis of liver fibrosis*. Annu Rev Pathol, 2011. **6**: p. 425-56.
59. Knittel, T., et al., *Expression of matrix metalloproteinases and their inhibitors during hepatic tissue repair in the rat*. Histochem Cell Biol, 2000. **113**(6): p. 443-53.
60. Ramachandran, P. and J.P. Iredale, *Liver fibrosis: a bidirectional model of fibrogenesis and resolution*. QJM, 2012. **105**(9): p. 813-7.
61. Yu, Q. and I. Stamenkovic, *Cell surface-localized matrix metalloproteinase-9 proteolytically activates TGF-beta and promotes tumor invasion and angiogenesis*. Genes Dev, 2000. **14**(2): p. 163-76.
62. Radbill, B.D., et al., *Loss of matrix metalloproteinase-2 amplifies murine toxin-induced liver fibrosis by upregulating collagen I expression*. Dig Dis Sci, 2011. **56**(2): p. 406-16.
63. Onozuka, I., et al., *Cholestatic liver fibrosis and toxin-induced fibrosis are exacerbated in matrix metalloproteinase-2 deficient mice*. Biochem Biophys Res Commun, 2011. **406**(1): p. 134-40.
64. Roeb, E., et al., *TIMP expression in toxic and cholestatic liver injury in rat*. J Hepatol, 1997. **27**(3): p. 535-44.
65. Yoshiji, H., et al., *Tissue inhibitor of metalloproteinases-1 attenuates spontaneous liver fibrosis resolution in the transgenic mouse*. Hepatology, 2002. **36**(4 Pt 1): p. 850-60.
66. Myers, M.G., Jr. and M.F. White, *The new elements of insulin signaling. Insulin receptor substrate-1 and proteins with SH2 domains*. Diabetes, 1993. **42**(5): p. 643-50.
67. Baumann, C.A., et al., *CAP defines a second signalling pathway required for insulin-stimulated glucose transport*. Nature, 2000. **407**(6801): p. 202-7.
68. Chiang, S.H., et al., *Insulin-stimulated GLUT4 translocation requires the CAP-dependent activation of TC10*. Nature, 2001. **410**(6831): p. 944-8.
69. Kotani, K., P. Wilden, and T.S. Pillay, *SH2-Balpa is an insulin-receptor adapter protein and substrate that interacts with the activation loop of the insulin-receptor kinase*. Biochem J, 1998. **335** ( Pt 1): p. 103-9.
70. Lock, P., F. Casagrande, and A.R. Dunn, *Independent SH2-binding sites mediate interaction of Dok-related protein with RasGTPase-activating protein and Nck*. J Biol Chem, 1999. **274**(32): p. 22775-84.

71. Noguchi, T., et al., *Tyrosine phosphorylation of p62(Dok) induced by cell adhesion and insulin: possible role in cell migration*. EMBO J, 1999. **18**(7): p. 1748-60.
72. Pawson, T. and J.D. Scott, *Signaling through scaffold, anchoring, and adaptor proteins*. Science, 1997. **278**(5346): p. 2075-80.
73. Yenush, L. and M.F. White, *The IRS-signalling system during insulin and cytokine action*. Bioessays, 1997. **19**(6): p. 491-500.
74. Withers, D.J., et al., *Irs-2 coordinates Igf-1 receptor-mediated beta-cell development and peripheral insulin signalling*. Nat Genet, 1999. **23**(1): p. 32-40.
75. Uchida, T., M.G. Myers, Jr., and M.F. White, *IRS-4 mediates protein kinase B signaling during insulin stimulation without promoting antiapoptosis*. Mol Cell Biol, 2000. **20**(1): p. 126-38.
76. Bjornholm, M., et al., *Absence of functional insulin receptor substrate-3 (IRS-3) gene in humans*. Diabetologia, 2002. **45**(12): p. 1697-702.
77. Yenush, L., et al., *The pleckstrin homology and phosphotyrosine binding domains of insulin receptor substrate 1 mediate inhibition of apoptosis by insulin*. Mol Cell Biol, 1998. **18**(11): p. 6784-94.
78. Burks, D.J., et al., *Heterologous pleckstrin homology domains do not couple IRS-1 to the insulin receptor*. J Biol Chem, 1997. **272**(44): p. 27716-21.
79. Taniguchi, C.M., B. Emanuelli, and C.R. Kahn, *Critical nodes in signalling pathways: insights into insulin action*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2006. **7**(2): p. 85-96.
80. White, M.F., R. Maron, and C.R. Kahn, *Insulin rapidly stimulates tyrosine phosphorylation of a Mr-185,000 protein in intact cells*. Nature, 1985. **318**(6042): p. 183-6.
81. Sun, X.J., et al., *Structure of the insulin receptor substrate IRS-1 defines a unique signal transduction protein*. Nature, 1991. **352**(6330): p. 73-7.
82. Araki, E., et al., *Human skeletal muscle insulin receptor substrate-1. Characterization of the cDNA, gene, and chromosomal localization*. Diabetes, 1993. **42**(7): p. 1041-54.
83. Araki, E., et al., *Characterization and regulation of the mouse insulin receptor substrate gene promoter*. Mol Endocrinol, 1995. **9**(10): p. 1367-79.
84. Dhe-Paganon, S., et al., *Crystal structure of the pleckstrin homology-phosphotyrosine binding (PH-PTB) targeting region of insulin receptor substrate 1*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(15): p. 8378-83.
85. Burks, D.J., et al., *IRS pleckstrin homology domains bind to acidic motifs in proteins*. J Biol Chem, 1998. **273**(47): p. 31061-7.
86. Lemmon, M.A., K.M. Ferguson, and J. Schlessinger, *PH domains: diverse sequences with a common fold recruit signaling molecules to the cell surface*. Cell, 1996. **85**(5): p. 621-4.
87. Van Obberghen, E., et al., *Surfing the insulin signaling web*. Eur J Clin Invest, 2001. **31**(11): p. 966-77.
88. Virkamaki, A., K. Ueki, and C.R. Kahn, *Protein-protein interaction in insulin signaling and the molecular mechanisms of insulin resistance*. J Clin Invest, 1999. **103**(7): p. 931-43.
89. Patti, M.E., et al., *4PS/insulin receptor substrate (IRS)-2 is the alternative substrate of the insulin receptor in IRS-1-deficient mice*. J Biol Chem, 1995. **270**(42): p. 24670-3.
90. Tobe, K., et al., *Identification of a 190-kDa protein as a novel substrate for the insulin receptor kinase functionally similar to insulin receptor substrate-1*. J Biol Chem, 1995. **270**(11): p. 5698-701.
91. Wang, L.M., et al., *IRS-1: essential for insulin- and IL-4-stimulated mitogenesis in hematopoietic cells*. Science, 1993. **261**(5128): p. 1591-4.
92. Vassen, L., W. Wegrzyn, and L. Klein-Hitpass, *Human insulin receptor substrate-2: gene organization and promoter characterization*. Diabetes, 1999. **48**(9): p. 1877-80.
93. Sun, X.J., et al., *The IRS-2 gene on murine chromosome 8 encodes a unique signaling adapter for insulin and cytokine action*. Mol Endocrinol, 1997. **11**(2): p. 251-62.

94. Sun, X.J., et al., *Role of IRS-2 in insulin and cytokine signalling*. Nature, 1995. **377**(6545): p. 173-7.
95. Sawka-Verhelle, D., et al., *Insulin receptor substrate-2 binds to the insulin receptor through its phosphotyrosine-binding domain and through a newly identified domain comprising amino acids 591-786*. J Biol Chem, 1996. **271**(11): p. 5980-3.
96. Johnston, J.A., et al., *Interleukins 2, 4, 7, and 15 stimulate tyrosine phosphorylation of insulin receptor substrates 1 and 2 in T cells. Potential role of JAK kinases*. J Biol Chem, 1995. **270**(48): p. 28527-30.
97. Platanias, L.C., et al., *The type I interferon receptor mediates tyrosine phosphorylation of insulin receptor substrate 2*. J Biol Chem, 1996. **271**(1): p. 278-82.
98. Copps, K.D. and M.F. White, *Regulation of insulin sensitivity by serine/threonine phosphorylation of insulin receptor substrate proteins IRS1 and IRS2*. Diabetologia, 2012. **55**(10): p. 2565-2582.
99. Greene, M.W. and R.S. Garofalo, *Positive and negative regulatory role of insulin receptor substrate 1 and 2 (IRS-1 and IRS-2) serine/threonine phosphorylation*. Biochemistry, 2002. **41**(22): p. 7082-91.
100. Zick, Y., *Insulin resistance: a phosphorylation-based uncoupling of insulin signaling*. Trends Cell Biol, 2001. **11**(11): p. 437-41.
101. Avruch, J., *Insulin signal transduction through protein kinase cascades*. Mol Cell Biochem, 1998. **182**(1-2): p. 31-48.
102. Vadas, O., et al., *Structural basis for activation and inhibition of class I phosphoinositide 3-kinases*. Sci Signal, 2011. **4**(195): p. re2.
103. Myers, M.G., Jr., et al., *IRS-1 activates phosphatidylinositol 3'-kinase by associating with src homology 2 domains of p85*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(21): p. 10350-4.
104. Shaw, L.M., *The insulin receptor substrate (IRS) proteins: at the intersection of metabolism and cancer*. Cell Cycle, 2011. **10**(11): p. 1750-6.
105. Alessi, D.R., et al., *Characterization of a 3-phosphoinositide-dependent protein kinase which phosphorylates and activates protein kinase B $\alpha$* . Curr Biol, 1997. **7**(4): p. 261-9.
106. Le Good, J.A., et al., *Protein kinase C isotypes controlled by phosphoinositide 3-kinase through the protein kinase PDK1*. Science, 1998. **281**(5385): p. 2042-5.
107. Frame, S. and P. Cohen, *GSK3 takes centre stage more than 20 years after its discovery*. Biochem J, 2001. **359**(Pt 1): p. 1-16.
108. Tran, H., et al., *The many forks in FOXO's road*. Sci STKE, 2003. **2003**(172): p. RE5.
109. Puigserver, P., et al., *Insulin-regulated hepatic gluconeogenesis through FOXO1-PGC-1 $\alpha$  interaction*. Nature, 2003. **423**(6939): p. 550-5.
110. Buday, L. and J. Downward, *Epidermal growth factor regulates p21ras through the formation of a complex of receptor, Grb2 adapter protein, and Sos nucleotide exchange factor*. Cell, 1993. **73**(3): p. 611-20.
111. Lowenstein, E.J., et al., *The SH2 and SH3 domain-containing protein GRB2 links receptor tyrosine kinases to ras signaling*. Cell, 1992. **70**(3): p. 431-42.
112. Alessi, D.R., et al., *Identification of the sites in MAP kinase kinase-1 phosphorylated by p74raf-1*. EMBO J, 1994. **13**(7): p. 1610-9.
113. Pages, G., et al., *Constitutive mutant and putative regulatory serine phosphorylation site of mammalian MAP kinase kinase (MEK1)*. EMBO J, 1994. **13**(13): p. 3003-10.
114. Papin, C., et al., *B-Raf protein isoforms interact with and phosphorylate Mek-1 on serine residues 218 and 222*. Oncogene, 1995. **10**(8): p. 1647-51.
115. Clayton, P.E., et al., *Growth hormone, the insulin-like growth factor axis, insulin and cancer risk*. Nat Rev Endocrinol, 2011. **7**(1): p. 11-24.
116. Chen, R.H., C. Sarnecki, and J. Blenis, *Nuclear localization and regulation of erk- and rsk-encoded protein kinases*. Mol Cell Biol, 1992. **12**(3): p. 915-27.

117. Davis, R.J., *The mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway*. J Biol Chem, 1993. **268**(20): p. 14553-6.
118. Hill, C.S. and R. Treisman, *Transcriptional regulation by extracellular signals: mechanisms and specificity*. Cell, 1995. **80**(2): p. 199-211.
119. Boucher, J., A. Kleinridders, and C.R. Kahn, *Insulin receptor signaling in normal and insulin-resistant states*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2014. **6**(1).
120. Tamemoto, H., et al., *Insulin resistance and growth retardation in mice lacking insulin receptor substrate-1*. Nature, 1994. **372**(6502): p. 182-6.
121. Araki, E., et al., *Alternative pathway of insulin signalling in mice with targeted disruption of the IRS-1 gene*. Nature, 1994. **372**(6502): p. 186-90.
122. Sesti, G., et al., *Defects of the insulin receptor substrate (IRS) system in human metabolic disorders*. FASEB J, 2001. **15**(12): p. 2099-111.
123. Kulkarni, R.N., et al., *Tissue-specific knockout of the insulin receptor in pancreatic beta cells creates an insulin secretory defect similar to that in type 2 diabetes*. Cell, 1999. **96**(3): p. 329-39.
124. Yamauchi, T., et al., *Insulin signalling and insulin actions in the muscles and livers of insulin-resistant, insulin receptor substrate 1-deficient mice*. Mol Cell Biol, 1996. **16**(6): p. 3074-84.
125. Previs, S.F., et al., *Contrasting effects of IRS-1 versus IRS-2 gene disruption on carbohydrate and lipid metabolism in vivo*. J Biol Chem, 2000. **275**(50): p. 38990-4.
126. Gazdag, A.C., et al., *Calorie restriction increases insulin-stimulated glucose transport in skeletal muscle from IRS-1 knockout mice*. Diabetes, 1999. **48**(10): p. 1930-6.
127. Withers, D.J., et al., *Disruption of IRS-2 causes type 2 diabetes in mice*. Nature, 1998. **391**(6670): p. 900-4.
128. Burks, D.J., et al., *IRS-2 pathways integrate female reproduction and energy homeostasis*. Nature, 2000. **407**(6802): p. 377-82.
129. Schubert, M., et al., *Insulin receptor substrate-2 deficiency impairs brain growth and promotes tau phosphorylation*. J Neurosci, 2003. **23**(18): p. 7084-92.
130. Rother, K.I., et al., *Evidence that IRS-2 phosphorylation is required for insulin action in hepatocytes*. J Biol Chem, 1998. **273**(28): p. 17491-7.
131. Valverde, A.M., et al., *Molecular mechanisms of insulin resistance in IRS-2-deficient hepatocytes*. Diabetes, 2003. **52**(9): p. 2239-48.
132. Valverde, A.M., et al., *IRS-2 mediates the antiapoptotic effect of insulin in neonatal hepatocytes*. Hepatology, 2004. **40**(6): p. 1285-94.
133. Higaki, Y., et al., *Insulin receptor substrate-2 is not necessary for insulin- and exercise-stimulated glucose transport in skeletal muscle*. J Biol Chem, 1999. **274**(30): p. 20791-5.
134. Gonzalez-Rodriguez, A., et al., *Resveratrol treatment restores peripheral insulin sensitivity in diabetic mice in a sirt1-independent manner*. Mol Nutr Food Res, 2015. **59**(8): p. 1431-42.
135. Kubota, N., et al., *Disruption of insulin receptor substrate 2 causes type 2 diabetes because of liver insulin resistance and lack of compensatory beta-cell hyperplasia*. Diabetes, 2000. **49**(11): p. 1880-9.
136. Hennige, A.M., et al., *Upregulation of insulin receptor substrate-2 in pancreatic beta cells prevents diabetes*. J Clin Invest, 2003. **112**(10): p. 1521-32.
137. Elchebly, M., et al., *Increased insulin sensitivity and obesity resistance in mice lacking the protein tyrosine phosphatase-1B gene*. Science, 1999. **283**(5407): p. 1544-8.
138. Inada, S., et al., *Glucose enhances protein tyrosine phosphatase 1B gene transcription in hepatocytes*. Mol Cell Endocrinol, 2007. **271**(1-2): p. 64-70.
139. Gonzalez-Rodriguez, A., et al., *Inhibition of PTP1B restores IRS1-mediated hepatic insulin signaling in IRS2-deficient mice*. Diabetes, 2010. **59**(3): p. 588-99.
140. Dong, X.C., et al., *Inactivation of hepatic Foxo1 by insulin signaling is required for adaptive nutrient homeostasis and endocrine growth regulation*. Cell Metab, 2008. **8**(1): p. 65-76.

141. Brown, M.S. and J.L. Goldstein, *Selective versus total insulin resistance: a pathogenic paradox*. Cell Metab, 2008. **7**(2): p. 95-6.
142. Kubota, N., et al., *Differential hepatic distribution of insulin receptor substrates causes selective insulin resistance in diabetes and obesity*. Nat Commun, 2016. **7**: p. 12977.
143. Viollet, B., et al., *Cellular and molecular mechanisms of metformin: an overview*. Clin Sci (Lond), 2012. **122**(6): p. 253-70.
144. Xu, H., et al., *Metformin improves hepatic IRS2/PI3K/Akt signaling in insulin-resistant rats of NASH and cirrhosis*. J Endocrinol, 2016. **229**(2): p. 133-44.
145. Brunt, E.M., et al., *Nonalcoholic steatohepatitis: a proposal for grading and staging the histological lesions*. Am J Gastroenterol, 1999. **94**(9): p. 2467-74.
146. Alnouti, Y., I.L. Csanaky, and C.D. Klaassen, *Quantitative-profiling of bile acids and their conjugates in mouse liver, bile, plasma, and urine using LC-MS/MS*. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2008. **873**(2): p. 209-17.
147. Xu, L., et al., *Human hepatic stellate cell lines, LX-1 and LX-2: new tools for analysis of hepatic fibrosis*. Gut, 2005. **54**(1): p. 142-51.
148. Bruning, J.C., et al., *Role of brain insulin receptor in control of body weight and reproduction*. Science, 2000. **289**(5487): p. 2122-5.
149. Lee, S.J., et al., *Homocysteine enhances MMP-9 production in murine macrophages via ERK and Akt signaling pathways*. Toxicol Appl Pharmacol, 2012. **260**(1): p. 89-94.
150. Ghosh, A.K. and D.E. Vaughan, *PAI-1 in tissue fibrosis*. J Cell Physiol, 2012. **227**(2): p. 493-507.
151. Hellerbrand, C., et al., *The role of TGFbeta1 in initiating hepatic stellate cell activation in vivo*. J Hepatol, 1999. **30**(1): p. 77-87.
152. Gressner, A.M., et al., *Roles of TGF-beta in hepatic fibrosis*. Front Biosci, 2002. **7**: p. d793-807.
153. Gong, Z., et al., *Chenodeoxycholic acid activates NLRP3 inflammasome and contributes to cholestatic liver fibrosis*. Oncotarget, 2016. **7**(51): p. 83951-83963.
154. Fuentes-Broto, L., et al., *Lipid and protein oxidation in hepatic homogenates and cell membranes exposed to bile acids*. Free Radic Res, 2009. **43**(11): p. 1080-9.
155. Fuentes-Broto, L., et al., *Melatonin protects against tauro lithocholic-induced oxidative stress in rat liver*. J Cell Biochem, 2010. **110**(5): p. 1219-25.
156. Svegliati-Baroni, G., et al., *Insulin and insulin-like growth factor-1 stimulate proliferation and type I collagen accumulation by human hepatic stellate cells: differential effects on signal transduction pathways*. Hepatology, 1999. **29**(6): p. 1743-51.
157. Cadoret, A., et al., *IGF-1R contributes to stress-induced hepatocellular damage in experimental cholestasis*. Am J Pathol, 2009. **175**(2): p. 627-35.
158. Nishizawa, H., et al., *IGF-I induces senescence of hepatic stellate cells and limits fibrosis in a p53-dependent manner*. Sci Rep, 2016. **6**: p. 34605.
159. Scharf, J.G., et al., *Characterization of the IGF axis components in isolated rat hepatic stellate cells*. Hepatology, 1998. **27**(5): p. 1275-84.
160. Arthur, M.J., *Fibrogenesis II. Metalloproteinases and their inhibitors in liver fibrosis*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2000. **279**(2): p. G245-9.
161. Loesch, M., et al., *p38gamma MAPK cooperates with c-Jun in trans-activating matrix metalloproteinase 9*. J Biol Chem, 2010. **285**(20): p. 15149-58.
162. Gong, J., et al., *Paired related homeobox protein 1 regulates PDGF-induced chemotaxis of hepatic stellate cells in liver fibrosis*. Lab Invest, 2017. **97**(9): p. 1020-1032.
163. Zhang, F., et al., *Tetramethylpyrazine reduces glucose and insulin-induced activation of hepatic stellate cells by inhibiting insulin receptor-mediated PI3K/AKT and ERK pathways*. Mol Cell Endocrinol, 2014. **382**(1): p. 197-204.
164. Wang, J., et al., *microRNA-29b prevents liver fibrosis by attenuating hepatic stellate cell activation and inducing apoptosis through targeting PI3K/AKT pathway*. Oncotarget, 2015. **6**(9): p. 7325-38.

165. Cho, H., et al., *Insulin resistance and a diabetes mellitus-like syndrome in mice lacking the protein kinase Akt2 (PKB beta)*. Science, 2001. **292**(5522): p. 1728-31.
166. He, L., et al., *Activation of hepatic stellate cell in Pten null liver injury model*. Fibrogenesis Tissue Repair, 2016. **9**: p. 8.
167. Arroba, A.I., et al., *Loss of protein tyrosine phosphatase 1B increases IGF-I receptor tyrosine phosphorylation but does not rescue retinal defects in IRS2-deficient mice*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2013. **54**(6): p. 4215-25.
168. Yi, X., et al., *Insulin receptor substrate 2 is essential for maturation and survival of photoreceptor cells*. J Neurosci, 2005. **25**(5): p. 1240-8.
169. Gratuze, M. and E. Planel, *Regulation of brain insulin signaling: A new function for tau*. J Exp Med, 2017. **214**(8): p. 2171-2173.
170. Fasshauer, M., et al., *Essential role of insulin receptor substrate 1 in differentiation of brown adipocytes*. Mol Cell Biol, 2001. **21**(1): p. 319-29.
171. Talbot, K., et al., *Demonstrated brain insulin resistance in Alzheimer's disease patients is associated with IGF-1 resistance, IRS-1 dysregulation, and cognitive decline*. J Clin Invest, 2012. **122**(4): p. 1316-38.
172. Muguerza, B., et al., *Antifibrogenic effect in vivo of low doses of insulin-like growth factor-I in cirrhotic rats*. Biochim Biophys Acta, 2001. **1536**(2-3): p. 185-95.
173. Castilla-Cortazar, I., et al., *Hepatoprotective effects of insulin-like growth factor I in rats with carbon tetrachloride-induced cirrhosis*. Gastroenterology, 1997. **113**(5): p. 1682-91.
174. Sanz, S., et al., *Expression of insulin-like growth factor I by activated hepatic stellate cells reduces fibrogenesis and enhances regeneration after liver injury*. Gut, 2005. **54**(1): p. 134-41.
175. Donaghy, A., et al., *Growth hormone therapy in patients with cirrhosis: a pilot study of efficacy and safety*. Gastroenterology, 1997. **113**(5): p. 1617-22.
176. Moller, S., et al., *The acid-labile subunit of the ternary insulin-like growth factor complex in cirrhosis: relation to liver dysfunction*. J Hepatol, 2000. **32**(3): p. 441-6.
177. Donaghy, A., et al., *Growth hormone, insulinlike growth factor-1, and insulinlike growth factor binding proteins 1 and 3 in chronic liver disease*. Hepatology, 1995. **21**(3): p. 680-8.

## **8. ANEXO**

**Publicaciones realizadas durante el periodo de la Tesis Doctoral:**

- Villar-Lorenzo, A., Ardiles A.E., Arroba, A.I., Hernández-Jiménez, E., Pardo, V., López-Collazo, E., Jiménez, I.A., Bazzocchi, I.L., González-Rodríguez, A., & Valverde, Á. M. (2016). Friedelane-type triterpenoids as selective anti-inflammatory agents by regulation of differential signaling pathways in LPS-stimulated macrophages. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 313, 57-67.





## Friedelane-type triterpenoids as selective anti-inflammatory agents by regulation of differential signaling pathways in LPS-stimulated macrophages



Andrea Villar-Lorenzo<sup>a,b</sup>, Alejandro E. Ardiles<sup>c,d,1</sup>, Ana I. Arroba<sup>a,b,1</sup>, Enrique Hernández-Jiménez<sup>e,f,1</sup>, Virginia Pardo<sup>a,b</sup>, Eduardo López-Collazo<sup>e,f</sup>, Ignacio A. Jiménez<sup>c</sup>, Isabel L. Bazzocchi<sup>c</sup>, Águeda González-Rodríguez<sup>a,b,\*</sup>, Ángela M. Valverde<sup>a,b,\*</sup>

<sup>a</sup> Instituto de Investigaciones Biomédicas Alberto Sols (IIBm) (CSIC/UAM), C/ Arturo Duperier 4, 28029 Madrid, Spain

<sup>b</sup> Centro de Investigación Biomédica en Red de Diabetes y Enfermedades Metabólicas Asociadas (CIBERdem), ISCIII, 28029 Madrid, Spain

<sup>c</sup> Instituto Universitario de Bio-Organica Antonio González, Departamento de Química Orgánica, Universidad de La Laguna, Avenida Astrofísico Francisco Sánchez 2, 38206 La Laguna, Tenerife, Spain

<sup>d</sup> Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad Arturo Prat, Casilla 121, Iquique 1110939, Chile

<sup>e</sup> Tumor Immunology Laboratory (IdiPAZ), 28029 Madrid, Spain

<sup>f</sup> Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Respiratorias (CIBERes), ISCIII, 28029 Madrid, Spain

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 5 May 2016

Revised 24 September 2016

Accepted 5 October 2016

Available online 15 October 2016

#### Keywords:

Macrophages  
Triterpenoids  
Inflammation  
Lipopolysaccharide  
Nitric oxide synthase  
Antioxidant enzymes

### ABSTRACT

A series of 31 pentacyclic triterpenoids isolated from the root barks of *Celastrus vulcanicola* and *Maytenus jelskii* were tested for cytotoxicity and inhibitory activity against lipopolysaccharide (LPS)-induced nitric oxide (NO) production in RAW 264.7 macrophages. Compounds 18 (C18) and 25 (C25) exhibited significant inhibition of LPS-induced NO release at 50 and 25  $\mu$ M concentrations, respectively, and decreased mRNAs of pro-inflammatory cytokines. At the molecular level, C18 neither inhibited LPS-mediated phosphorylation of mitogen activated protein kinases (MAPKs) nor nuclear translocation of nuclear factor kappa beta (NF $\kappa$ B). Instead, C18 enhanced and prolonged nuclear translocation of nuclear factor-erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) and increased the expression of its target genes including hemeoxygenase 1 (HO1). C25 efficiently inhibited LPS-mediated phosphorylation of JNK, p38 and ERK, without affecting NF $\kappa$ B or Nrf2 signaling pathways. Both compounds reduced LPS-mediated processing of caspase-1 and the cleavage of interleukin 1 $\beta$  (IL1 $\beta$ ) proform, reflecting their ability to target the inflammasome. C25 also counteracted LPS effects on iNOS expression and pro-inflammatory cytokines mRNA levels in Bv-2 microglial cells. The anti-inflammatory effect of both compounds was also assessed in human macrophages. Our results suggest that triterpenoids C18 and C25 possess anti-inflammatory effects, which may be therapeutically relevant for diseases linked to inflammation.

© 2016 Elsevier Inc. All rights reserved.

### 1. Introduction

Inflammation is the first ubiquitous defensive reaction of the immune system to infection or irritation that leads ultimately to the

restoration of tissue structure and function. However, prolonged inflammation can cease to be a beneficial event and it contributes to the pathogenesis of many disease states including chronic asthma, rheumatoid arthritis, multiple sclerosis, and psoriasis, all of them with increasing incidence rate that are particularly debilitating to the patient's functional capacity and quality of life (Lawrence et al., 2002).

Macrophages are key mediators of the early stages during the inflammatory process and their activation by bacterial products such as lipopolysaccharide (LPS) promotes the synthesis and release of nitric oxide (NO), pro-inflammatory cytokines, eicosanoids and bioactive lipids, all of them intermediaries involved in the inflammatory onset (Zhang and Mosser, 2008; Ohashi et al., 2015). Indeed, targeting the inducible nitric oxide synthase (iNOS), the enzyme responsible for NO synthesis, has been proposed as an anti-inflammatory therapeutic

\* Corresponding authors at: Instituto de Investigaciones Biomédicas Alberto Sols, C/ Arturo Duperier 4, 28029 Madrid, Spain.

E-mail addresses: [avillar@iib.uam.es](mailto:avillar@iib.uam.es) (A. Villar-Lorenzo), [ale\\_csic@gmail.com](mailto:ale_csic@gmail.com) (A.E. Ardiles), [arroba@iib.uam.es](mailto:arroba@iib.uam.es) (A.I. Arroba), [enheji@gmail.com](mailto:enheji@gmail.com) (E. Hernández-Jiménez), [vpardo@iib.uam.es](mailto:vpardo@iib.uam.es) (V. Pardo), [elopez@salud.madrid.org](mailto:elopez@salud.madrid.org) (E. López-Collazo), [ignadiaz@gmail.com](mailto:ignadiaz@gmail.com) (I.A. Jiménez), [ilopez@ulles.es](mailto:ilopez@ulles.es) (I.L. Bazzocchi), [agueda@iib.uam.es](mailto:agueda@iib.uam.es) (Á. González-Rodríguez), [avalverde@iib.uam.es](mailto:avalverde@iib.uam.es) (Á.M. Valverde).

<sup>1</sup> Equal contributors.

<sup>2</sup> Present address: Hospital Universitario Santa Cristina, Instituto de Investigación Sanitaria Princesa (IIS-P), Madrid, Spain.

strategy since high concentrations of NO are essential in inflammation and related processes (Aktan, 2004). The pro-inflammatory response of macrophages to LPS, known as M1 or classical activation, functions predominantly in situations of tissue damage, killing of intracellular microbes, and increased tumor activity (Gordon and Taylor, 2005).

At the molecular level, multiple signaling pathways are activated by LPS through the binding to the Toll-like receptor 4 (TLR4), including the three subgroups of mitogen-activated protein kinases (MAPKs): c-jun N-terminal kinase (JNK), p38 protein kinase (p38) and extracellular signal-regulated kinases (ERK1/2), as well as the IKK-I $\kappa$ B $\alpha$  signaling pathway responsible to the nuclear translocation of the transcription factor nuclear factor kappa B (NF $\kappa$ B). This complex signaling network leads to the generation of different inflammatory mediators such as tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ), interleukins 1 $\beta$  and 6 (IL1 $\beta$ , IL6), prostaglandin E2 and NO (Guha and Mackman, 2001; Gasparini and Feldmann, 2012).

The transcription factor nuclear factor-erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) is a master regulator of the cellular antioxidant responses that has also been suggested to play an important role in the inflammatory processes linked to cellular oxidative stress through the regulation of protective antioxidant genes including heme oxygenase 1 (HO1) (Lee and Johnson, 2004). Studies in HO1-null mice (Poss and Tonegawa, 1997) as well as the first reported HO1-deficient human (Yachie et al., 1999; Saikawa et al., 2000) have strengthened the potent anti-inflammatory properties of HO1. In this regard, it has been described that carbon monoxide (CO), the remaining principal end-product of heme catalysis by HO1, counteracted the effects of LPS in the expression of pro-inflammatory cytokines in macrophages (Otterbein et al., 2000). Consequently, Nrf2 activators are presented as potential therapeutic agents against inflammation.

Natural products and their derivatives constitute a valuable source of therapeutic agents and historically they have been used to treat a variety of diseases (Newman and Cragg, 2012; Butler et al., 2014). Currently, these natural drugs are good candidates to minimize metabolic diseases such as diabetes, cardiovascular diseases, neurological diseases such as Alzheimer's, Parkinson's, migraines or multiple sclerosis, inflammatory diseases and for the treatment of various cancers (Thomas et al., 2008; Cragg et al., 2009; Sultana and Saify, 2012; Liu et al., 2015). Among natural compounds, pentacyclic triterpenoids are a class of structurally rich metabolites with privileged motifs (Hill and Connolly, 2015) that have attracted much interest due to their wide occurrence and broad range of biological activities (Sheng and Sun, 2011; Rufino-Palomares et al., 2013), including anti-inflammatory properties (Sultana and Saify, 2012). In a previous study, we have characterized natural friedelane triterpenoids (31 compounds) from *Celastraceae* species, two of which displayed insulin sensitization properties in hepatocytes (Ardiles et al., 2012).

In the present study we hypothesized that some of these compounds might have anti-inflammatory effects. We have made use of cell-based assays in mouse RAW 264.7 macrophages and Bv-2 microglial cells, as well as in human peripheral monocytes differentiated to macrophages to investigate whether this series of friedelane triterpenoids may exert anti-inflammatory properties and to unravel the signaling pathways involved.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Materials

Reagents for electrophoresis were from Bio-Rad (Hercules, CA, USA). Tissue culture dishes were from Corning Inc. (Corning, New York, USA), and fetal bovine serum (FBS) and culture media were from Invitrogen and Gibco (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA). LPS from *Escherichia coli* was purchased from InvivoGen (San Diego, CA, USA).

### 2.2. Friedelane tripterpenoids

Compounds 1–31 were isolated from the roots barks of *Celastrus vulcanicola* and *Maytenus jelskii*, and their isolation and structure elucidation have been previously reported (Ardiles et al., 2012).

### 2.3. Cell culture and treatments

Murine macrophage RAW 264.7 and microglia Bv-2 cell lines were maintained in RPMI medium supplemented with 10% heat-inactivated FBS, antibiotics (100 U/ml penicillin and 100  $\mu$ g/ml streptomycin) and 2 mM L-glutamine at 37 °C in a humidified atmosphere with 5% CO<sub>2</sub>. Cells were pretreated for 1 h with dimethyl sulfoxide (DMSO) as vehicle or with triterpenoids at the doses indicated in FBS-free medium and further stimulated with 150 ng/ml LPS for different time periods or stimulated with triterpenoids in the absence of LPS.

Immortalized neonatal hepatocytes, generated and characterized as previously described (Gonzalez-Rodriguez et al., 2007), were grown in Dulbecco's modified Eagle's Medium (DMEM) supplemented with 10% FBS, antibiotics (100 U/ml penicillin and 100  $\mu$ g/ml streptomycin) and 2 mM L-glutamine. Confluent cells were pretreated with vehicle (DMSO) or with the indicated triterpenoids ( $\mu$ M) for 24 h, further cultured in FBS-free medium for 2 h and then stimulated with insulin (10 nM) for 10 min.

Human blood was obtained from healthy donors, and peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated from buffy coats following standard protocols. This study received the approval of the Committee of Ethics and Clinical Investigation of the Universidad Autónoma de Madrid, (Spain). Briefly, whole blood was layered on top of a Ficoll cushion (Ficoll-Plaque Plus; GE Healthcare, Madrid, Spain) and centrifuged at 1800 rpm for 30 min at room temperature. The lymphocyte/monocytic fraction was isolated, washed with phosphate-buffered saline (PBS) and subjected to red blood cell lysis (ammonium chloride solution; Stem cell Technologies) for 5 min at room temperature, and following an additional wash with PBS, monocytes were cultured under adherent conditions in RPMI medium in a humidified atmosphere with 5% CO<sub>2</sub> at 37 °C for 1 h. After washing the upper layer, adhered monocytes were cultured for 7 to 10 days in complete RPMI medium to allow for differentiation into macrophages. Then, cells were pretreated with vehicle (DMSO) or with the indicated triterpenoids ( $\mu$ M) for 24 h, and further stimulated with 10 ng/ml LPS for different time periods (1 h for mRNA expression and 16 h for protein expression) or stimulated with triterpenoids in the absence of LPS.

### 2.4. Flow cytometer analysis

For the surface marker staining, cells were labeled with the monoclonal antibody anti-CD14 (Immunostep, Salamanca, Spain). Matched isotype antibodies were used as negative controls. Then, cells were incubated in the dark for 30 min at 4 °C. Data was analyzed by flow cytometry using a BD FACSCalibur flow cytometer (BD Biosciences, Madrid, Spain), using Cell Quest Pro software (BD Biosciences).

### 2.5. Cytometric bead array (CBA)

Cytokine levels in the culture supernatants from human macrophages were determined using the CBA Flex Set (BD Biosciences) following the manufacturer's protocol. Data collected were analyzed by flow cytometry using a BD FACSCalibur flow cytometer (BD Biosciences).

### 2.6. Analysis of nitrite accumulation (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>)

Levels of NO<sub>2</sub><sup>-</sup> were measured using the Griess method. Briefly, nitrites turn into a pink compound in contact with an acid solution (1% sulphanilamide and 0.1% N-(1-naphthyl) ethylenediamine (NEDA),



and can be quantified by a colorimetric method at 540 nm in a microplate reader (Versamax Tunable Microplate reader, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA).

#### 2.7. Analysis of the cellular viability by crystal violet staining

After cell treatments, the medium was discarded, and the remaining viable adherent cells were stained with crystal violet (0.2% w/v in 2% ethanol) for 20 min. After this time, plates were rinsed with tap water and allowed to dry, and 1% SDS was added to solubilize them. The absorbance of each plate was read spectrophotometrically at 560 nm.

#### 2.8. Preparation of protein extracts and Western Blot

Cell lysates were obtained by scraping off cultured dishes with ice cold lysis buffer (25 mM Hepes, 2.5 mM EDTA, 0.1% (v/v) Triton X-100, 1 mM PMSF and 5 µg/ml leupeptin) followed by 10 min incubation on ice. After protein content determination with Bradford reagent, total protein were boiled in Laemmli sample buffer and submitted to 8–15% SDS-PAGE. Proteins were transferred to Immunoblot PVDF membranes (Merk Millipore, Billerica, MA, USA) and, after blocking with 3% BSA or 5% non-fat dry milk, membranes were incubated overnight with several antibodies as indicated. Immunoreactive bands were visualized using the ECL Western blotting protocol (Bio-Rad, Madrid, Spain). Densitometric analysis of the bands was performed using Image J software. The anti-phospho-JNK (9251), anti-phospho-ERK1/2 (9101), anti-caspase-1 (sc-514) and anti-ERK1/2 (4695) antibodies were from Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA). The anti-phospho-IR (sc-25103), anti-IRβ (sc-711), anti-phospho-Akt (Ser 473) (sc-7985), anti-Akt (sc-8312), anti-JNK (sc-571), anti-phospho-p38 (sc-17852), anti-p38 (sc-9212), anti-heme oxygenase 1 (HO1) (H-105) (sc-10,789), anti-IκBα (sc-371), anti-p65 NFκB (sc-372), anti-iNOS (sc-650) and anti-Nrf2 (sc-722) antibodies were from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA). Anti-α-tubulin (T5168) and β-actin (A5441) antibodies were from Sigma-Aldrich (Madrid, Spain). Anti-laminB antibody (ab16048) was purchased from Abcam (Cambridge, UK). Anti-L-1β antibody (AF-401-NA) was from R&D Systems Inc. (Minneapolis, USA).

#### 2.9. Preparation of nuclear and cytosolic fractions

Cells were harvested, washed once with ice-cold PBS, lysed directly in hypotonic buffer (10 mM Hepes pH 7.9, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 10 mM KCl, 1 mM DTT, 0.5 mM PMSF, 5 mM NaF, 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 120 mM NaCl, 0.5% (v/v) NP40, 0.75 µg/ml leupeptin and 0.75 µg/ml aprotinin) and incubated for 5 min at 4 °C. Then, sucrose's buffer (50 mM Hepes pH 7, 0.25 mM EDTA, 10 mM KCl and 70% (w/v) sucrose) was added to avoid the nucleus disruption and incubation was prolonged for 10 min at 4 °C. After centrifugation, the supernatant containing the cytosolic fraction was collected. Then, the pellet was shocked at 4 °C during 20 min with hypertonic buffer (20 mM Hepes pH 7.9, 25% (v/v) glycerol, 420 mM NaCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM EDTA, 0.5 mM DTT, 0.5 mM PMSF, 0.75 µg/ml leupeptin and 0.75 µg/ml aprotinin) and, after centrifugation, the nuclear fraction was collected in the supernatant. Both supernatants were processed to determine protein concentration using the Bio—Rad protein reagent and stored at –20 °C until processing.

#### 2.10. Immunofluorescence

Cells were seeded on glass coverslip slides (Menzel-Gläser, Braunschweig, Germany) and stained with anti-p65 NFκB and anti-rabbit conjugated Alexa 488 (Molecular Probes, ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA) antibodies. Immunofluorescence was examined in a Nikon Eclipse 90i microscope with imaging software Nis elements (Nikon, Nikon Instruments Europe B.V.).

#### 2.11. RNA extraction and quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR)

Total RNA was extracted from the cells using TRI Reagent (Sigma). One µg of RNA was reverse transcribed with High Capacity cDNA Archive Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). qRT-PCR was performed with an ABI 7900 sequence detector using the SyBr Green method and d(N)6 random hexamer with the primers for mouse. RNA expression was corrected by β-actin expression. Primer sequences are available under request.

#### 2.12. Statistical analysis

Data are presented as mean ± SEM, and were compared by using the Bonferroni ANOVA test. All statistical analyses were performed using the GraphPad Prism 5.0 software (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA) software with 2-sided tests. Differences were considered statistically significant at  $p < 0.05$ .

### 3. Results

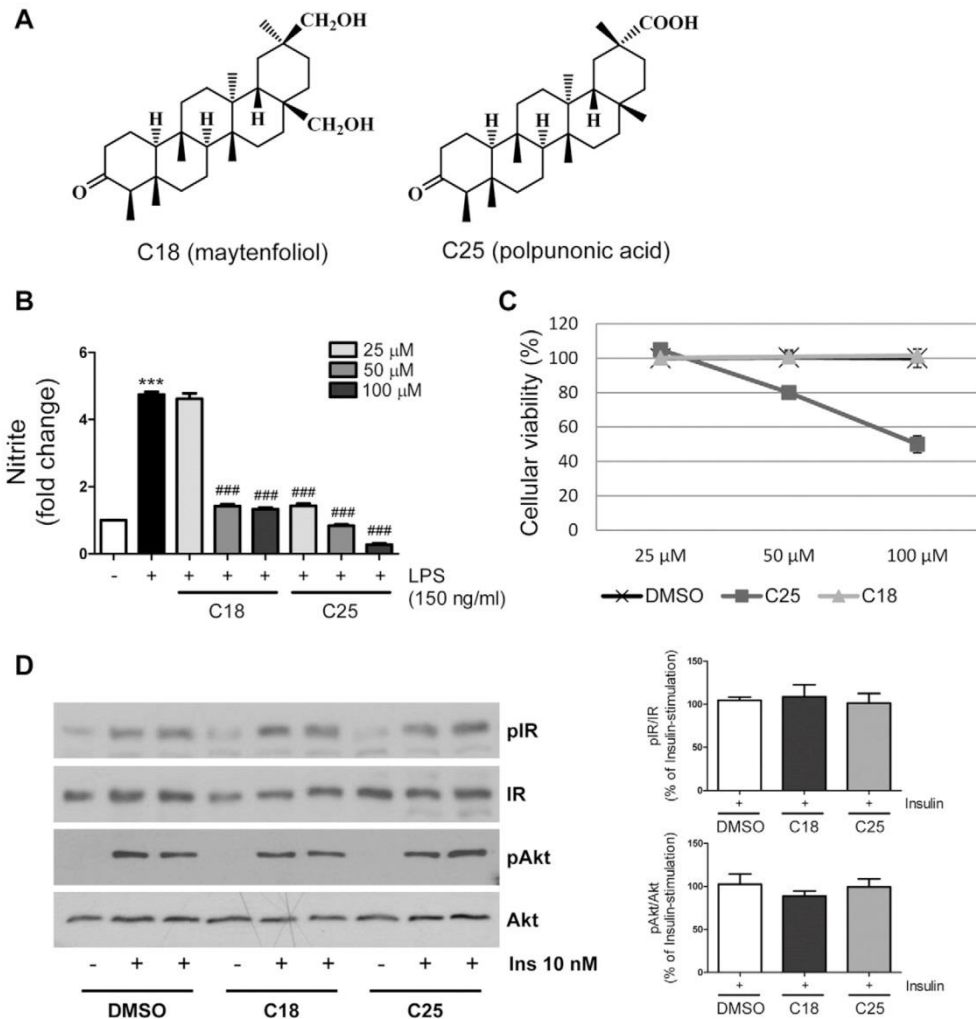
#### 3.1. Inhibition of LPS-induced NO release by friedelane triterpenoids

Friedelane triterpenoids (1–31, Supplementary Fig. 1) were dissolved in DMSO and used at final concentrations of 12.5, 25 and 50 µM. In an initial screening, compounds which displayed reduced solubility in DMSO (C16, C17, C21, C29 and C30) or decreased by >10% the cellular viability of RAW 264.7 macrophages at the 25 µM concentration in the violet crystal assay staining (C5, C9, C11, C12, C15, C19, C26 and C31) were excluded for further analysis. Consequently, a series of 18 friedelane triterpenoid compounds was selected for evaluation of their potential anti-inflammatory activity. To achieve this, LPS-induced nitrite production was measured in the culture media of RAW 264.7 macrophages pretreated with these triterpenoids for 1 h at their non-toxic concentrations followed by incubation with LPS (150 ng/ml) for a further 24 h. As depicted in Supplementary Fig. 2, significant inhibition of nitrite accumulation in the culture media was only observed with compounds 18 (C18, maytenfoliol) and 25 (C25, polpunonic acid) at 50 and 25 µM concentrations, respectively. Based on that, we selected both compounds for further experiments. Fig. 1A shows the chemical structure of triterpenoids C18 (left panel) and C25 (right panel). In order to provide a better appreciation of their relative potencies, we performed dose-response curves of NO release for C18 and C25 compounds. As depicted in Fig. 1B, nitrite accumulation in the culture medium was inhibited in a dose-dependent manner by both compounds. In order to confirm that the inhibitory effect of C18 and C25 on NO release was not due to cytotoxicity, we analyzed the cellular viability under similar experimental conditions (Fig. 1C). Quantification analysis of crystal violet staining showed that cell viability was not affected by C18 compound at 50 µM concentration, whereas C25 elicited toxicity at 50 µM but not at 25 µM, dose at which this compound effectively inhibited NO release (Fig. 1B, C).

Importantly, compounds 1 (C1) and 3 (C3), that enhanced the insulin signaling in hepatocytes (Ardiles et al., 2012), did not elicit any anti-inflammatory effect in RAW 264.7 macrophages (Supplementary Fig. 2), while C18 and C25 that decreased LPS-mediated nitrite production (Fig. 1B, Supplementary Fig. 2) did not exert any effect on IR or Akt phosphorylations in response to insulin in hepatic cells (Fig. 1D). These differences reflect the cellular-specific actions of friedelane triterpenoids.

#### 3.2. Effects of C18 on LPS-mediated induction of iNOS and activation of pro-inflammatory signaling pathways in RAW 264.7 and human macrophages

LPS-increased nitrite concentration in the culture medium was decreased by 60% in RAW 264.7 macrophages pretreated with C18

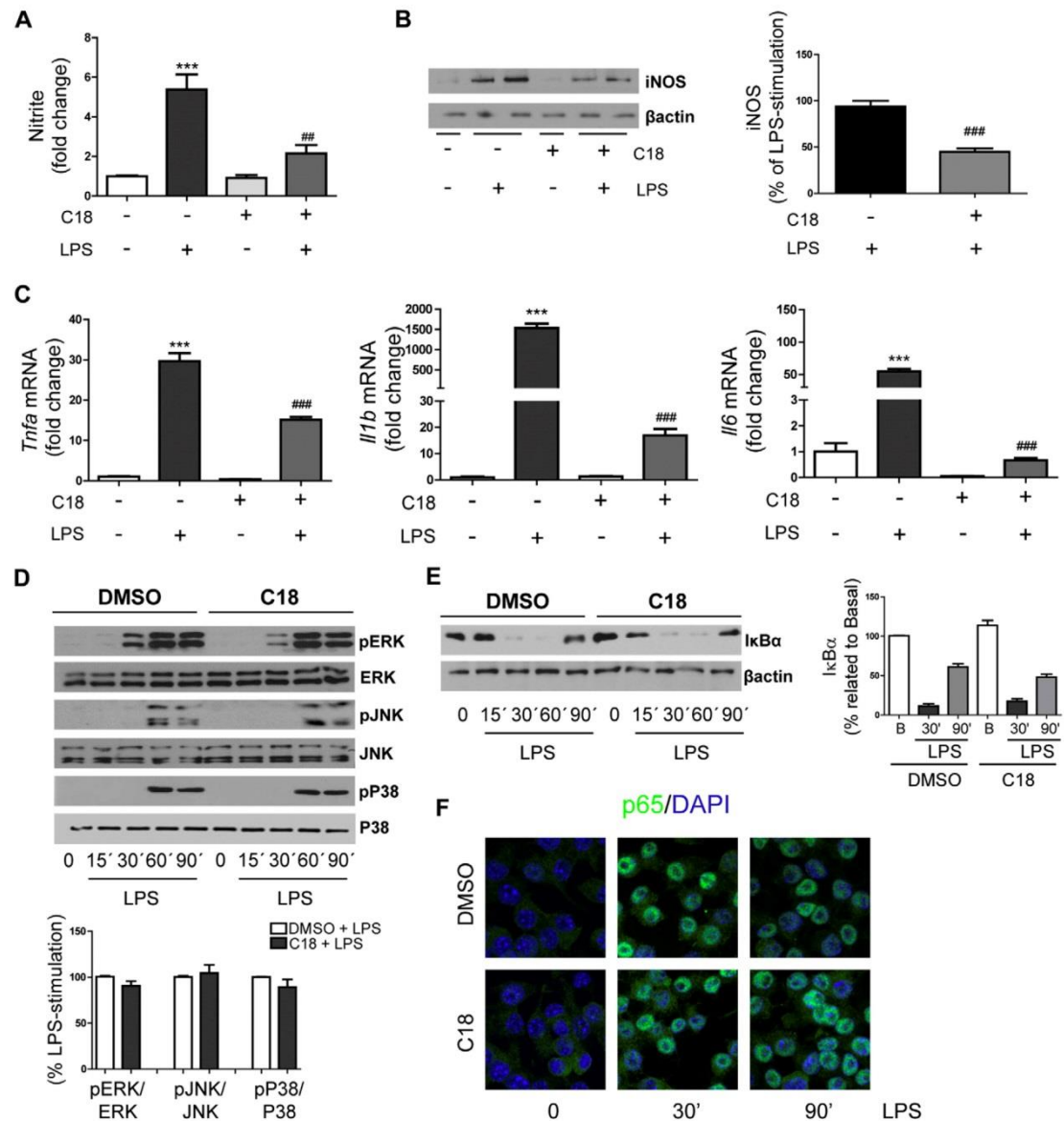


**Fig. 1.** Dose-dependent effects of C18 and C25 on NO release and cytotoxicity. RAW 264.7 macrophages were pretreated for 1 h with DMSO or with the selected triterpenoids at the indicated concentrations, followed by stimulation with 150 ng/ml LPS for 24 h. **A.** Chemical structures of C18 (left panel) and C25 (right panel). **B.** Nitrite accumulation in the culture media was measured using the Griess method. Results are expressed as fold change relative to the untreated condition and are mean  $\pm$  SEM ( $n \geq 3$  independent experiments performed in duplicate). **C.** Cellular viability was determined by crystal violet assay. Results are expressed as percentage of absorbance relative to the untreated condition and are mean  $\pm$  SEM ( $n = 3$  independent experiments performed in duplicate). **D.** Immortalized mouse hepatocytes were treated 24 h with C18 (50  $\mu$ M) or C25 (25  $\mu$ M) followed by stimulation with 10 nM insulin for 10 min. Total protein was analyzed by Western blot using the indicated antibodies. Representative blots are shown. After quantification of all blots, results are expressed as % of insulin stimulation relative to DMSO condition (100%) and are mean  $\pm$  SEM ( $n \geq 3$  experiments performed in duplicate). \*\*\* $p < 0.005$ , LPS vs. untreated cells; ### $p < 0.005$ , C18 or C25 vs. DMSO.

(Fig. 2A), and this effect was parallel to the reduction in the protein expression of iNOS (Fig. 2B). Of note, treatment of RAW 264.7 cells with this compound alone did not modify nitrite levels or iNOS protein expression. Next, we explored whether C18 was able to decrease the expression of pro-inflammatory cytokines induced by LPS. As Fig. 2C shows, *Tnfa*, *Il6* and *Il1b* mRNA levels significantly increased after 2 h of treatment with LPS in RAW 264.7 macrophages and C18 significantly decreased these elevations. Of note, *Tnfa* and *Il1b*, but not *Il6*, mRNA levels were decreased after a longer period (8 h) of treatment with LPS in the presence of C18 compound.

In order to determine the molecular mechanisms involved in the anti-inflammatory effect exerted by C18, we examined MAPKs and NF $\kappa$ B-mediated signaling pathways. Treatment of RAW 264.7 cells with LPS rapidly activated MAPKs by inducing the phosphorylation of ERK, JNK and p38, and the maximal effect was elicited after 60 min (Fig. 2D). Pretreatment with C18 did not affect MAPKs signaling in response to LPS. Similarly, no differences were found when we explored NF $\kappa$ B-mediated signaling. As depicted in Fig. 2E, C18 did not alter the degradation of I $\kappa$ B $\alpha$ , the inhibitory protein that sequesters NF $\kappa$ B in the cytoplasm. We also analyzed the subcellular distribution of the p65

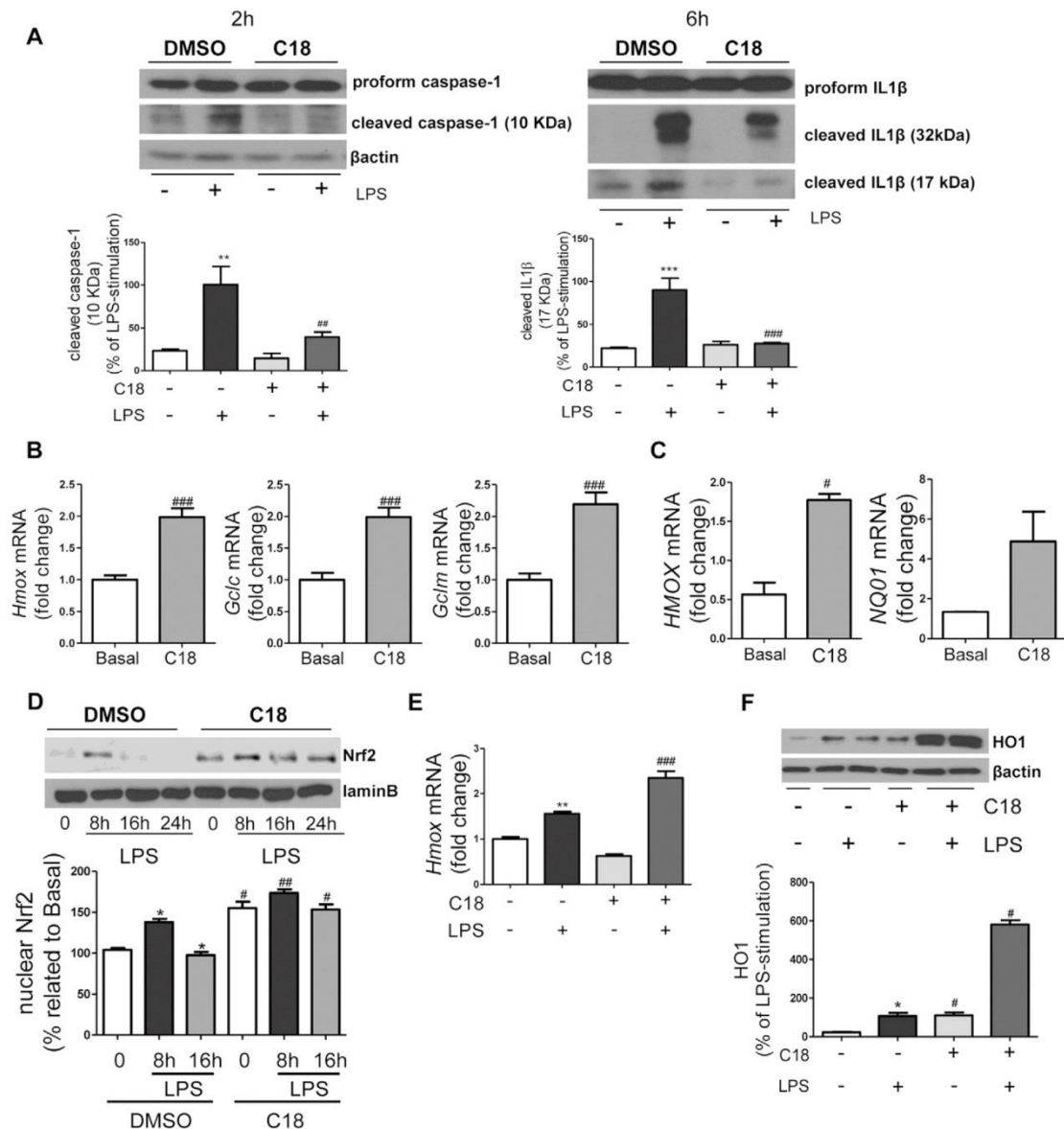




**Fig. 2.** Effects of C18 on LPS-mediated induction of iNOS and activation of pro-inflammatory signaling pathways in RAW 264.7 and human macrophages. **A.** RAW 264.7 macrophages were pretreated for 1 h with DMSO or 50  $\mu$ M C18, followed by stimulation with 150 ng/ml LPS for 24 h. Nitrite accumulation in the culture media was measured using the Griess method. Results are expressed as fold change relative to the untreated condition and are mean  $\pm$  SEM ( $n \geq 8$  independent experiments performed in duplicate). **B.** (left panel) Total protein was analyzed by Western blot using the indicated antibodies. Representative blots are shown. (right panel) After quantification of all blots, results are expressed as % of iNOS induction relative to relative to LPS condition (100%) and are mean  $\pm$  SEM ( $n \geq 4$  independent experiments performed in duplicate). **C.** RAW 264.7 macrophages were pretreated for 1 h with DMSO or 50  $\mu$ M C18, followed by stimulation with 150 ng/ml LPS for 2 h. *Tnfa*, *Il1b* and *Il6* mRNA levels were analyzed by qRT-PCR. Results are expressed as fold change relative to the untreated condition and are mean  $\pm$  SEM ( $n = 3$  independent experiments performed in triplicate). **D.** RAW 264.7 macrophages were pretreated for 1 h with DMSO or 50  $\mu$ M C18, followed by stimulation with 150 ng/ml LPS for the indicated time-periods. Total protein was analyzed by Western blot using the indicated antibodies. Representative blots are shown. After quantification of all blots, results are expressed as % of MAPK stimulation relative to the maximum phosphorylation levels (60 min condition, 100%) or % of IκBα levels relative to the basal condition (100%), respectively, and are mean  $\pm$  SEM ( $n = 3$  independent experiments). **E.** RAW 264.7 macrophages were pretreated for 1 h with DMSO or 50  $\mu$ M C18, followed by stimulation with 150 ng/ml LPS for the indicated time-periods. Total protein was analyzed by Western blot using the indicated antibodies. Representative blots are shown. After quantification of all blots, results are expressed as % of IκBα stimulation relative to the maximum phosphorylation levels (60 min condition, 100%) or % of IκBα levels relative to the basal condition (100%), respectively, and are mean  $\pm$  SEM ( $n = 3$  independent experiments). **F.** Representative images after p65-NFκB immunostaining. \*\*\* $p < 0.005$ , LPS vs. untreated cells; ## $p < 0.01$ , ### $p < 0.005$ , C18 vs. DMSO.

NFκB subunit by immunofluorescence and found a similar pattern of its nuclear accumulation in RAW 264.7 cells stimulated with LPS regardless of the pretreatment with the C18 compound (Fig. 2F).

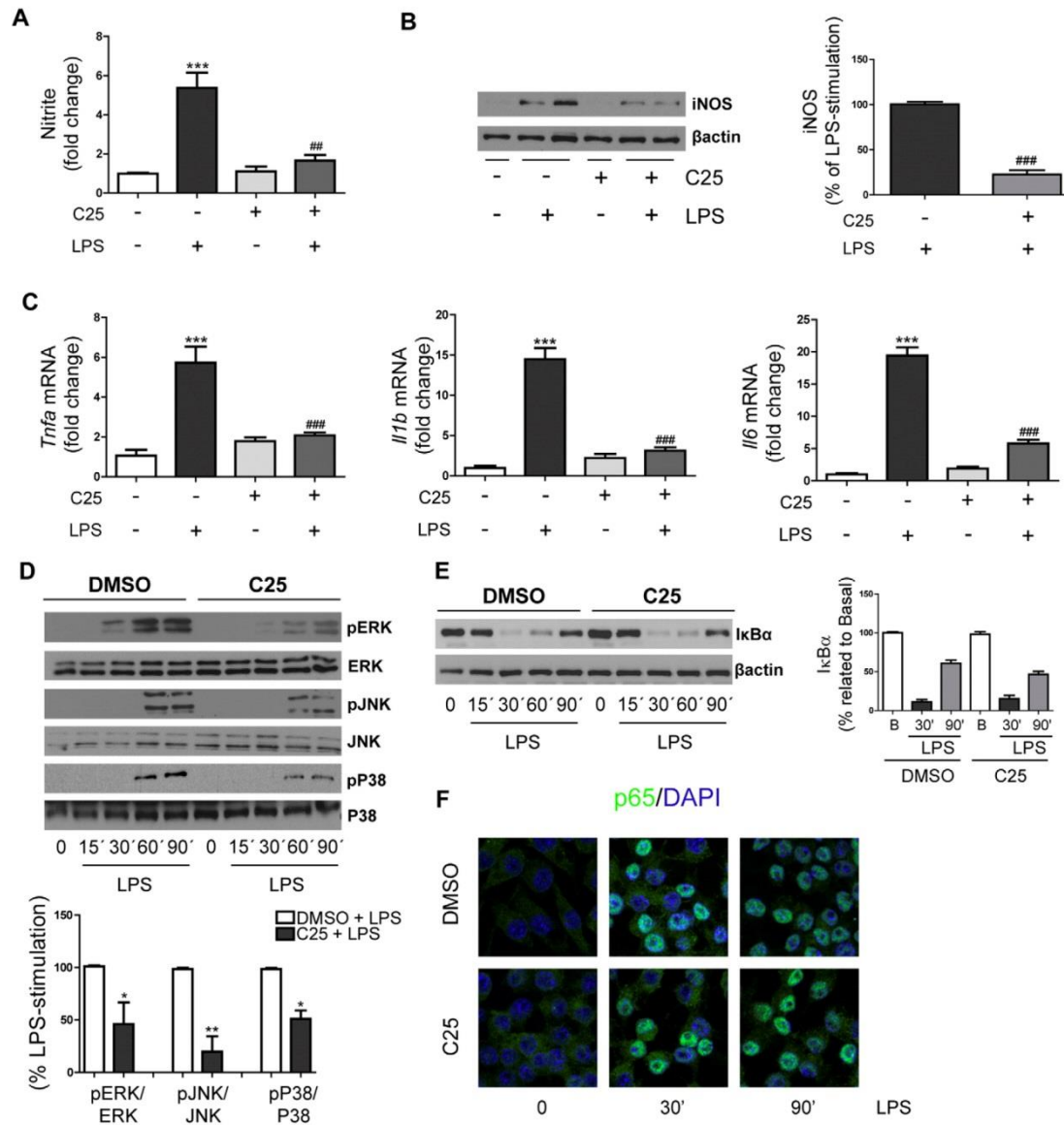
In order to explore additional molecular mechanisms that could explain the anti-inflammatory effect of C18 triterpenoid in RAW 264.7 cells we examined the NLRP3 inflammasome. Recently, activation of



**Fig. 3.** Effects of C18 in the Nrf2/HO1 in pathway activated by LPS in RAW 264.7 cells and human macrophages. **A.** RAW 264.7 macrophages were pretreated for 1 h with DMSO or 50  $\mu$ M C18, followed by stimulation with 150 ng/ml LPS for 2 (left panel) or 6 (right panel) h. Total protein was analyzed by Western blot using the indicated antibodies. Representative blots are shown. After quantification of all blots, results are expressed as % of cleaved caspase-1 or % of cleaved IL1 $\beta$ , respectively, relative to the LPS condition (100%), and are mean  $\pm$  SEM ( $n = 3$  independent experiments performed in duplicate). **B.** RAW 264.7 macrophages were treated with DMSO or 50  $\mu$ M C18 for 6 h. *Hmox*, *Gcl* and *Gclm* mRNA levels were analyzed by qRT-PCR. Results are expressed as fold change relative to the untreated condition and are mean  $\pm$  SEM ( $n = 3$  independent experiments performed in triplicate). **C.** Peripheral monocytes were isolated from healthy volunteers, differentiated into macrophages, and then treated with C18 for 16 h as described in Materials and Methods. *HMOX* and *NQO1* mRNA levels were analyzed by qRT-PCR. Results are expressed as fold change relative to the untreated condition and are mean  $\pm$  SEM ( $n = 3$  independent experiments performed in duplicate). **D,E,F.** RAW 264.7 macrophages were pretreated for 1 h with DMSO or 50  $\mu$ M C18, followed by stimulation with 150 ng/ml LPS for different time-periods (D) or 24 h (E, F). In panel D, nuclear protein extracts were analyzed by Western blot. After quantification of all blots, results are expressed as % of nuclear Nrf2 relative to the basal condition (100%) or % of HO1 induction relative to relative to LPS condition (100%), respectively, and are mean  $\pm$  SEM ( $n \geq 3$  independent experiments performed in duplicate). In panel E, *Hmox* mRNA levels were analyzed by qRT-PCR. In panel F, HO1 protein levels were analyzed by Western blot. Results are expressed as fold change relative to the untreated condition and are mean  $\pm$  SEM ( $n = 2$  independent experiments performed in triplicate). \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.005$ , LPS vs. untreated cells; # $p < 0.05$ , ## $p < 0.01$ , ### $p < 0.005$ , C18 vs. DMSO.

caspace-1 and the subsequent release of mature IL1 $\beta$  have been shown to be dependent on p38 MAPK (Gao et al., 2013). As IL1 $\beta$  is processed via caspace-1 through the NLRP3 inflammasome complex in LPS-

stimulated macrophages (Zitvogel et al., 2012), we explored if the anti-inflammatory effect of C18 was dependent on this system. As shown in Fig. 3A, the cleavage of pro-caspase-1 in response to LPS,

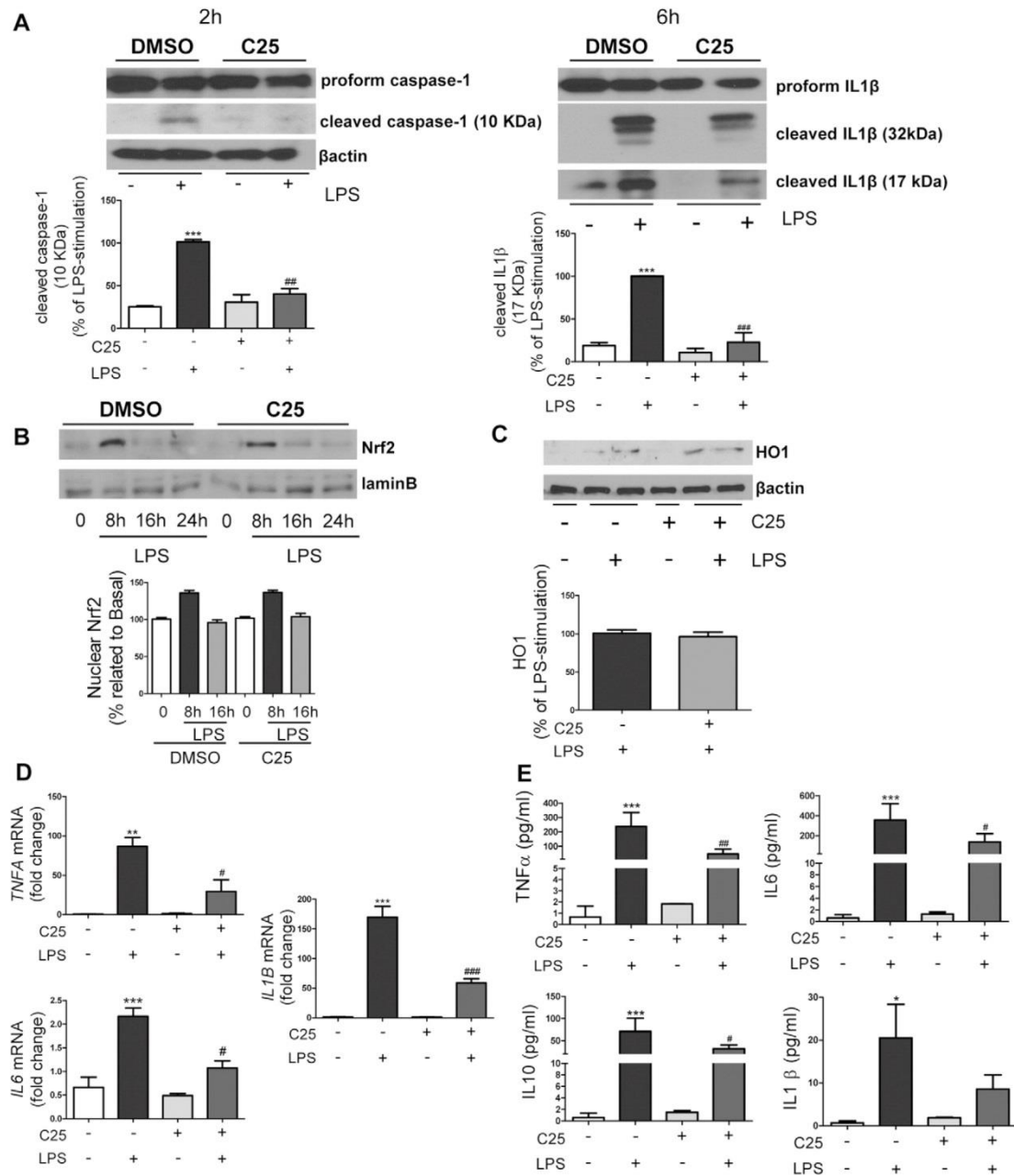


**Fig. 4.** Effects of C25 on LPS-mediated induction of iNOS and activation of pro-inflammatory signaling pathways in RAW 264.7 and human macrophages. RAW 264.7 macrophages were pretreated for 1 h with DMSO or 25  $\mu$ M C25, followed by stimulation with 150 ng/ml LPS for 24 h. **A.** Nitrite accumulation in the culture media was measured using the Griess method. Results are expressed as fold change relative to the untreated condition and are mean  $\pm$  SEM ( $n \geq 6$  independent experiments performed in duplicate). **B.** (left panel) Total protein was analyzed by Western blot using the indicated antibodies. Representative blots are shown. (right panel) After quantification of all blots, results are expressed as % of iNOS induction relative to LPS condition (100%) and are mean  $\pm$  SEM ( $n \geq 4$  independent experiments performed in duplicate). **C.** RAW 264.7 macrophages were pretreated for 1 h with DMSO or 25  $\mu$ M C25, followed by stimulation with 150 ng/ml LPS for 8 h. *Trifa*, *Il1b* and *Il6* mRNA levels were analyzed by qRT-PCR. Results are expressed as fold change relative to the untreated condition and are mean  $\pm$  SEM ( $n = 3$  independent experiments performed in triplicate). **D, E.** RAW 264.7 macrophages were pretreated for 1 h with DMSO or 25  $\mu$ M C25, followed by stimulation with 150 ng/ml LPS for different time-periods. Total protein was analyzed by Western blot using the indicated antibodies. Representative blots are shown. After quantification of all blots, results are expressed as % of MAPK stimulation relative to the maximum phosphorylation levels (60 min condition, 100%) or % of IkB $\alpha$  levels relative to the basal condition (100%), respectively, and are mean  $\pm$  SEM ( $n \geq 3$  independent experiments performed in duplicate). **F.** Representative images after p65-NF $\kappa$ B immunostaining. ( $n = 3$  independent experiments). \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.005$ , LPS vs. untreated cells; \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.005$ , C25 vs. DMSO.

detected at 2 h after LPS stimulation, was markedly attenuated in RAW 264.7 macrophages treated with C18. Also, the effect of this compound in the inflammasome was assessed by a decrease in the cleavage of the pro-IL1 $\beta$  into its active fragments by LPS which was detected at 6 h.

Next, we examined the effect of C18 triterpenoid in the induction of Nrf2 target genes since it has been demonstrated that Nrf2 plays a key role against inflammatory damage by regulating the antioxidant responses (Brune et al., 2013). qRT-PCR analysis revealed that total

cellular mRNA levels of the Nrf2 target genes HO1, encoded by the gene *Hmox* (heme oxygenase 1), *Gclm* (glutamate-cysteine ligase regulatory subunit) and *Gclc* (glutamate-cysteine ligase catalytic subunit) were significantly increased after incubation of RAW 264.7 cells with C18 triterpenoid for 6 h (Fig. 3B). To reinforce these results, we analyzed the expression of Nrf2 target genes in human peripheral monocytes isolated from healthy donors and differentiated into macrophages as described in Materials and Methods. These cells were incubated with





compound C18 for 16 h. As depicted in Fig. 3C, the antioxidant genes *HMOX1* (heme oxygenase-1) and *NQO1* (NAD(P)H quinone dehydrogenase 1) were up-regulated in human macrophages treated with this triterpenoid.

We also evaluated the effect of C18 in LPS-induced Nrf2 activity by the analysis of the dynamics of Nrf2 nuclear translocation in RAW 264.7 cells stimulated with LPS. The Western blot analysis shown in Fig. 3D revealed that Nrf2 was maximally accumulated in the nucleus at 8 h after LPS treatment, but it was retained for up to 24 h exclusively in cells pretreated with C18. Also, both basal and LPS-mediated Nrf2 nuclear translocation was increased in cells pretreated with this compound. Then, we analyzed HO1 mRNA and protein expression as an essential Nrf2 target gene that mediates the inhibition of the inflammatory responses. As depicted in Fig. 3E, mRNA levels of *Hmox* were increased in response to 24 h of LPS stimulation and C18 compound enhanced this response. Moreover, under these experimental conditions, LPS-induced HO1 protein content was higher in macrophages pretreated with C18 (Fig. 3F). Notably, mRNA levels of *Hmox* were increased by C18 at 6 h of treatment (Fig. 3B) whereas the direct effect of C18 in increasing HO1 protein content was detected at 24 h (Fig. 3F).

### 3.3. Effects of C25 on LPS-mediated induction of iNOS and activation of pro-inflammatory signaling pathways in RAW 264.7 and human macrophages

Similar analysis was performed with the triterpenoid C25. Fig. 4A shows that the inhibition of LPS-induced nitrite accumulation by C25 in RAW 264.7 cells was around 65% in parallel to a significant decrease of LPS-mediated up-regulation of iNOS protein expression (Fig. 4B). In contrast to C18 triterpenoid (Fig. 2C), the effect of triterpenoid C25 on the elevation of mRNAs of pro-inflammatory cytokines after 2 h of LPS stimulation was less potent since it only decreased *Tnfa* mRNA levels (Supplementary Fig. 3B). However, C25 almost abolished the increases in *Tnfa*, *Il1b* and *Il6* mRNA levels induced by LPS treatment for 8 h (Fig. 4C).

Next, we evaluated the signaling pathways activated by LPS and modulated by C25. Regarding MAPKs activation, LPS-induced early phosphorylation of ERK, p38, and JNK was blocked in the presence of C25 (Fig. 4D). Conversely, no differences were found in LPS-mediated degradation of I $\kappa$ B $\alpha$  that was detected at 30 min in both RAW 264.7 macrophages pretreated with C25 or untreated with this compound (Fig. 4E), or in the nuclear localization of p65 NF $\kappa$ B analyzed by immunofluorescence (Fig. 4F).

We also performed the analysis of the inflammasome and as shown in Fig. 5A, the cleavage of pro-caspase-1 in response to LPS stimulation for 2 h was attenuated in RAW 264.7 macrophages treated with C25. Additionally, the effect of this compound in the inflammasome was assessed by a decrease in the LPS-mediated cleavage of pro-IL1 $\beta$  into its active forms.

Interestingly, C25 did not seem to have antioxidant properties since neither LPS-induced Nrf2 nuclear accumulation nor HO1 protein expression were affected after incubation of RAW 264.7 macrophages with this compound (Fig. 5B and C).

The anti-inflammatory effects of C25 were also analyzed in human peripheral monocytes differentiated into macrophages. As depicted in

Fig. 5D, *TNFA*, *IL1B* and *IL6* mRNA levels in response to LPS stimulation were significantly reduced in human macrophages preincubated with this compound. Moreover, LPS-induced cytokine release was significantly decreased in the presence of C25 (Fig. 5E).

### 3.4. C25 decreased LPS-induced NO release, iNOS and mRNA levels of pro-inflammatory cytokines in mouse Bv-2 microglial cells

In order to extend the study of the anti-inflammatory properties of these two compounds to a different immune cell type, we analyzed their effects in Bv-2 cells, a mouse microglial cell line. Microglial cells are the resident immune cells in the central nervous system (Lynch, 2009). As depicted in Fig. 6A and B, both LPS-induced nitrite release to the culture media and iNOS protein content were markedly decreased by the pretreatment with 25  $\mu$ M C25. Importantly, this concentration of C25 did not decrease cellular viability of Bv-2 microglial cells (Supplementary Fig. 4). In the light of these results, *Tnfa*, *Il6* and *Il1b* mRNA levels, highly elevated by LPS in Bv-2 microglial cells, were significantly reduced by C25 (Fig. 6C). However, C18 did not counteract the effects of LPS in Bv-2 microglial cells (results not shown), reflecting the cellular-specificity of these compounds in different immune cells.

## 4. Discussion

Several reports have demonstrated that natural products, including triterpenoids, display anti-inflammatory properties (Sultana and Saify, 2012). In this study, we have investigated whether any compound of the collection of natural triterpenoids isolated from *Celastrus vulcanicola* and *Maytenus jelskii* (Ardiles et al., 2012) exerts anti-inflammatory effects in murine or human monocytes differentiated to macrophages and the molecular mechanisms involved.

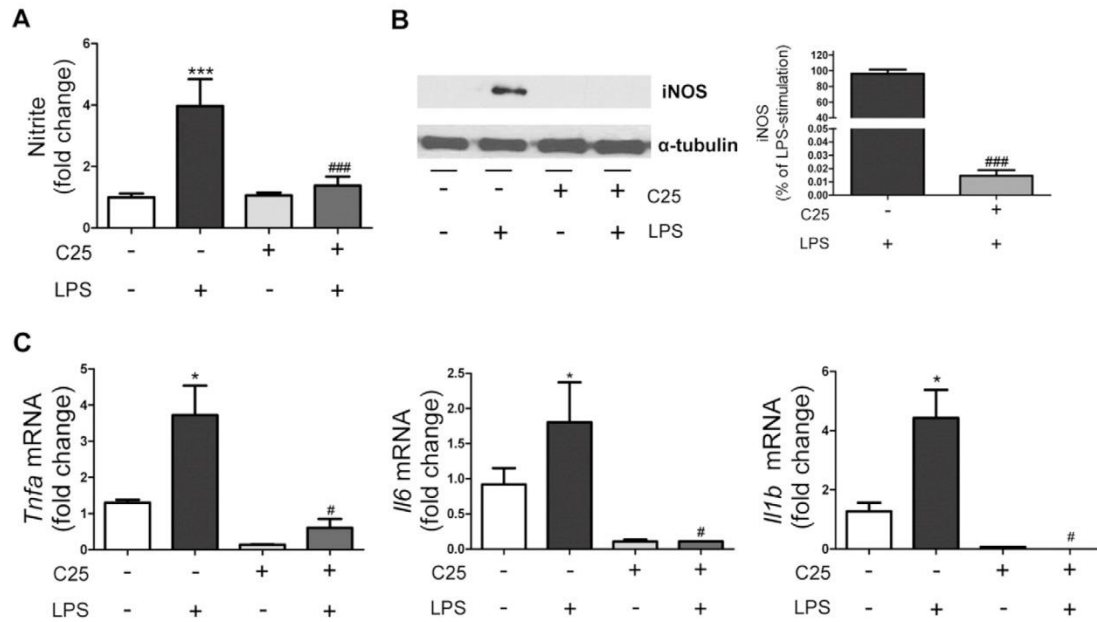
After an initial screening of the dose-dependent effect of all triterpenoids in the cellular viability of RAW 264.7 macrophages, we found that two of these compounds, C18 (maytenfoliol) and C25 (polpunonic acid), at non-toxic concentrations of 50 and 25  $\mu$ M, respectively, were able to inhibit NO production, one of the key features of the inflammatory stages.

In a previous study, we have demonstrated that triterpenoids C1 and C3 displayed an insulin mimetic effect in hepatocytes by their ability to improve insulin signaling, particularly IR and Akt phosphorylations (Ardiles et al., 2012). Curiously, these compounds did not suppress nitrite production in RAW 264.7 cells, excluding anti-inflammatory properties. On the other hand, C18 and C25 did not exert any effect on insulin signaling in hepatic cells, highlighting the fact that, although all these triterpenoids have similarities in their chemical structure, they differ in their biological effects and, importantly, this cellular-specificity may represent a therapeutic advantage that deserves further research.

Regarding the molecular mechanisms by which C18 and C25 inhibit LPS-induced NO release in Raw 264.7 macrophages, we found similarities but also substantial differences. As a common effect, both triterpenoids decreased the early activation of the NLRP3 inflammasome in response to LPS, as manifested by their ability to decrease the cleavage of the proforms of both caspase-1 and IL1 $\beta$  into

**Fig. 5.** Protective effects of C25 against LPS-mediated activation of the inflammasome in RAW 264.7 macrophages and elevation of pro-inflammatory cytokines in human macrophages. **A.** RAW 264.7 macrophages were pretreated for 1 h with DMSO or 25  $\mu$ M C25, followed by stimulation with 150 ng/ml LPS for 2 (left panel) or 6 (right panel) h. Total protein was analyzed by Western blot using the indicated antibodies. Representative blots are shown. After quantification of all blots, results are expressed as % of cleaved caspase-1 or % of cleaved IL1 $\beta$ , respectively, relative to LPS condition (100%), and are mean  $\pm$  SEM (n = 3 independent experiments performed in duplicate). **B, C.** RAW 264.7 macrophages were pretreated for 1 h with DMSO or 25  $\mu$ M C25, followed by stimulation with 150 ng/ml LPS for the indicated time-periods (B) or 24 h (C). Nuclear extracts (B) and total protein (C) were analyzed by Western blot using the indicated antibodies. Representative blots are shown. After quantification of all blots, results are expressed as % of nuclear Nrf2 relative to the basal condition (100%) or % of HO1 induction relative to LPS condition (100%), respectively, and are mean  $\pm$  SEM (n = 3 independent experiments performed in duplicate). **D.** Human peripheral monocytes were isolated from healthy volunteers, differentiated into macrophages, and pretreated with vehicle (DMSO) or with C25 (25  $\mu$ M) for 16 h, and further stimulated with 10 ng/ml LPS for 1 h. *TNFA*, *IL6* and *IL1B* mRNA levels were analyzed by qRT-PCR. Results are expressed as fold change relative to the untreated condition and are mean  $\pm$  SEM (n = 3 independent experiments performed in duplicate). **E.** Human macrophages were stimulated as described in D except in the treatment with LPS that was prolonged for 16 h. *TNFA*, *IL1B*, *IL10* and *IL-6* released by human macrophages were analyzed in the culture media. Results are expressed as cytokine concentration and are mean  $\pm$  SEM (n = 3 independent experiments performed in duplicate). \**p* < 0.05, \*\**p* < 0.01, \*\*\**p* < 0.005, LPS vs. untreated cells; #*p* < 0.05, ##*p* < 0.01, \*\*\**p* < 0.005, C25 vs. DMSO.





**Fig. 6.** Effects of C25 in mouse Bv-2 microglial cells activated by LPS. BV-2 cells were pretreated for 1 h with DMSO or 25  $\mu$ M C25, followed by stimulation with 150 ng/ml LPS for 24 h. **A.** Nitrite accumulation in the culture media was measured using the Griess method. Results are expressed as fold change relative to the untreated condition and are mean  $\pm$  SEM ( $n = 5$  independent experiments performed in duplicate). **B.** (left panel) Total protein was analyzed by Western blot using the indicated antibodies. Representative blots are shown. (right panel) After quantification of all blots, results are expressed as % of iNOS induction relative to LPS condition (100%) and are mean  $\pm$  SEM ( $n = 5$  independent experiments performed in duplicate). **C.** *Tnfa*, *Il1b* and *Il6* mRNA levels were analyzed by qRT-PCR. Results are expressed as fold change relative to the untreated condition and are mean  $\pm$  SEM ( $n = 3$  independent experiments performed in duplicate). \* $p < 0.05$ , \*\*\* $p < 0.005$ , LPS vs. untreated cells; # $p < 0.05$ , ### $p < 0.005$ , C18 or C25 vs. DMSO.

their corresponding active fragments. The NLRP3 inflammasome is the most widely studied and responds to a broad range of pathogen-associated molecular patterns (Broz and Monack, 2011). It is important to highlight that the effect of both compounds in decreasing the inflammasome activation was detected at a short time-periods after LPS stimulation (2–6 h) that in the case of C25 it can be dissected from its effect in reducing mRNA levels of IL1 $\beta$  that requires a longer LPS treatment (8 h). As it will be discussed below, the latter effect is probably mediated by alternative mechanisms likely to be additive and coordinated to decrease NO production in macrophages.

The specific antioxidant capacity of C18, manifested by its ability to directly induce Nrf2-target genes and also to enhance LPS-induced Nrf2 activity, is likely to be responsible for its anti-inflammatory effects in macrophages. This antioxidant effect of C18 triterpenoid is highly relevant since this compound failed to attenuate the activation of ERK, JNK and p38 MAPK, as well as NF $\kappa$ B-mediated signaling induced by LPS. It has been reported that Nrf2 plays an important role in the inflammatory process through the regulation of protective antioxidant genes, in particular HO1, which is essential for the inhibition of pro-inflammatory cytokine production (Otterbein et al., 2000). In fact, an absence of HO1 in mice promotes exaggerated inflammatory responses manifested by splenomegaly, lymphadenopathy, leukocytosis, and hepatic and renal inflammation, suggesting that its activity is necessary for timely resolution of the early inflammatory milieu (Poss and Tonegawa, 1997; Kapturczak et al., 2004; Orozco et al., 2007). Also, hallmarks of inflammation have been found in a human patient with HO1 deficiency (Yachie et al., 1999; Saikawa et al., 2000). Our data have revealed that higher Nrf2 nuclear accumulation and increased levels of Nrf2 target genes, including HO1, correlated with a decrease in LPS-mediated iNOS, TNF $\alpha$  and IL1 $\beta$  expression in RAW 264.7 macrophages treated with C18. Importantly, these Nrf2-mediated effects seemed to be

sufficient for counteracting the activation of MAPKs and NF $\kappa$ B signaling. These results are reinforced by recent reports describing other natural compounds such as magnolol (a bioactive compound obtained from *Magnolia officinalis*) (Lu et al., 2015), methanolic extract of *Salvia plebeia* (Akram et al., 2015) and citral (a major active compound in *Litsea cubeba*) (Yang et al., 2013) that display anti-inflammatory activities in macrophages through the activation of Nrf2/HO1 signaling.

Previous studies have reported the beneficial anti-inflammatory effects of chemical inducers of HO1 such as hemin (Willis et al., 1996). However, others have found off target effects of hemin beyond altering HO1 enzyme activity such as the induction of adhesion molecules (Wagener et al., 1997) or mitochondrial injury (Suliman et al., 2002). For such reasons, the use of natural compounds as activators of Nrf2/HO1 such as triterpenoid 18 might offer a therapeutic benefit that should be evaluated in preclinical studies with a special focus on the immune processes associated with transplant rejection, as demonstrated by the association between high levels of HO1 with increased allograft survival (Soares et al., 1998).

C25 compound also exhibited anti-inflammatory activity since it almost completely blocked LPS-induced iNOS and pro-inflammatory cytokines in RAW 264.7 macrophages. In contrast to C18, C25 did not enhance Nrf2/HO1 pathway, excluding its role in the protection against inflammation linked to oxidative stress. In this case, the key molecular mechanism involved was the suppression of LPS-mediated activation of MAPKs. It is well known that the phosphorylation of ERK, p38 and JNK, key molecules of the MAPKs signaling pathway, is critical for the ability of macrophages to respond to various inflammatory stimuli including LPS (Guha and Mackman, 2001). The mechanism by which C25 inhibits MAPKs activation remains unclear and further experiments are needed to clarify this issue; however, it is reasonable to speculate that it might act as an intracellular competitive inhibitor of the active



catalytic sites of these kinases, thereby blocking their downstream signaling pathways. This hypothesis is supported by lessons from knockout cellular and animal models. For instance, either knockdown of JNK in RAW 264.7 cells or p38 in bone marrow-derived macrophages was sufficient to decrease LPS-induced pro-inflammatory cytokines (Lai et al., 2013; Srivastava et al., 2015). Remarkably, C25 was able to counteract LPS-mediated elevations of nitrites and pro-inflammatory cytokines in BV-2 microglial cells pointing to possible beneficial effects against neuroinflammation in the central nervous system.

Finally, the beneficial effects of both compounds have been also found in monocytes from humans and in vitro differentiated to macrophages, highlighting the relevance of our results and their promising translational application. In summary, this study provides experimental evidences that triterpenoids C18 (maytenfoliol) and C25 (polpunonic acid) exert anti-inflammatory properties in macrophages through the up-regulation of Nrf2/HO1 signaling and the inhibition of MAPKs activation, respectively (schematic represented in the graphical abstract), being both compounds able to decrease the effect of LPS on the activation of the NLRP3 inflammasome system. Besides these signaling pathways, other targets might also mediate their anti-inflammatory activity. Taken together, our results suggest that triterpenoids C18 and C25 are bioactive agents that possess anti-inflammatory effects, which may be relevant as novel therapeutic candidates for diseases associated with excessive inflammation.

Supplementary data to this article can be found online at doi:10.1016/j.taap.2016.10.004.

### Conflicts of interest

Authors have not conflicts of interest.

### Transparency document

The Transparency document associated with this article can be found, in the online version.

### Acknowledgements

This work was supported by grants SAF2015-65267-R/FEDER (Ministerio de Economía y Competitividad, Spain), Centro de Investigación Biomédica en Red de Diabetes y Enfermedades Metabólicas Asociadas (CIBERdem, Instituto de Salud Carlos III, Spain), PIE14/00045-INFLAMES (Instituto de Salud Carlos III, Spain) to A.M.V., CP14/00181 (Instituto de Salud Carlos III, Spain) to A. G-R., Fundación CajaCanarias SALUCAN03 and SAF2015-65113-C2-1-R/FEDER to I.L.B. and Fondo de Investigación Sanitaria and Fondos FEDER to E. L.-C. Dr. A. E. thanks FONDECYT Postdoctoral 3160414 and CONICYT-Chile for the fellowship.

### References

- Akram, M., Syed, A.S., Kim, K.A., Lee, J.S., Chang, S.Y., Kim, C.Y., Bae, O.N., 2015. Heme oxygenase 1-mediated novel anti-inflammatory activities of Salvia plebeia and its active components. *J. Ethnopharmacol.* 174, 322–330.
- Aktan, F., 2004. iNOS-mediated nitric oxide production and its regulation. *Life Sci.* 75, 639–653.
- Ardiles, A.E., Gonzalez-Rodriguez, A., Nunez, M.J., Perestelo, N.R., Pardo, V., Jimenez, I.A., Valverde, A.M., Bazzocchi, I.L., 2012. Studies of naturally occurring friedelane triterpenoids as insulin sensitizers in the treatment type 2 diabetes mellitus. *Phytochemistry* 84, 116–124.
- Broz, P., Monack, D.M., 2011. Molecular mechanisms of inflammasome activation during microbial infections. *Immunol. Rev.* 243, 174–190.
- Brune, B., Dehne, N., Grossmann, N., Jung, M., Namgaladze, D., Schmid, T., von Knethen, A., Weigert, A., 2013. Redox control of inflammation in macrophages. *Antioxid. Redox Signal.* 19, 595–637.
- Butler, M.S., Robertson, A.A., Cooper, M.A., 2014. Natural product and natural product derived drugs in clinical trials. *Nat. Prod. Rep.* 31, 1612–1661.
- Cragg, G.M., Grothaus, P.G., Newman, D.J., 2009. Impact of natural products on developing new anti-cancer agents. *Chem. Rev.* 109, 3012–3043.
- Gao, F., Chen, D., Hu, Q., Wang, G., 2013. Rotenone directly induces BV2 cell activation via the p38 MAPK pathway. *PLoS One* 8, e72046.

- Gasparini, C., Feldmann, M., 2012. NF-kappaB as a target for modulating inflammatory responses. *Curr. Pharm. Des.* 18, 5735–5745.
- Gonzalez-Rodriguez, A., Clampt, J.E., Escibano, O., Benito, M., Rondinone, C.M., Valverde, A.M., 2007. Developmental switch from prolonged insulin action to increased insulin sensitivity in protein tyrosine phosphatase 1B-deficient hepatocytes. *Endocrinology* 148, 594–608.
- Gordon, S., Taylor, P.R., 2005. Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat. Rev. Immunol.* 5, 953–964.
- Guha, M., Mackman, N., 2001. LPS induction of gene expression in human monocytes. *Cell. Signal.* 13, 85–94.
- Hill, R.A., Connolly, J.D., 2015. Triterpenoids. *Nat. Prod. Rep.* 32, 273–327.
- Kapturczak, M.H., Wasserfall, C., Brusko, T., Campbell-Thompson, M., Ellis, T.M., Atkinson, M.A., Agarwal, A., 2004. Heme oxygenase-1 modulates early inflammatory responses: evidence from the heme oxygenase-1-deficient mouse. *Am. J. Pathol.* 165, 1045–1053.
- Lai, L., Song, Y., Liu, Y., Chen, Q., Han, Q., Chen, W., Pan, T., Zhang, Y., Cao, X., Wang, Q., 2013. MicroRNA-92a negatively regulates Toll-like receptor (TLR)-triggered inflammatory response in macrophages by targeting MKK4 kinase. *J. Biol. Chem.* 288, 7956–7967.
- Lawrence, T., Willoughby, D.A., Gilroy, D.W., 2002. Anti-inflammatory lipid mediators and insights into the resolution of inflammation. *Nat. Rev. Immunol.* 2, 787–795.
- Lee, J.M., Johnson, J.A., 2004. An important role of Nrf2-ARE pathway in the cellular defense mechanism. *J. Biochem. Mol. Biol.* 37, 139–143.
- Liu, J., Lee, J., Salazar Hernandez, M.A., Mazitschek, R., Ozcan, U., 2015. Treatment of obesity with celastrol. *Cell* 161, 999–1011.
- Lu, S.H., Hsu, W.L., Chen, T.H., Chou, T.C., 2015. Activation of Nrf2/HO-1 signaling pathway involves the anti-inflammatory activity of magnolol in Porphyromonas gingivalis lipopolysaccharide-stimulated mouse RAW 264.7 macrophages. *Int. Immunopharmacol.* 29, 770–778.
- Lynch, M.A., 2009. The multifaceted profile of activated microglia. *Mol. Neurobiol.* 40, 139–156.
- Newman, D.J., Cragg, G.M., 2012. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. *J. Nat. Prod.* 75, 311–335.
- Ohashi, W., Hattori, K., Hattori, Y., 2015. Control of macrophage dynamics as a potential therapeutic approach for clinical disorders involving chronic inflammation. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 354, 240–250.
- Orozco, L.D., Kapturczak, M.H., Barajas, B., Wang, X., Weinstein, M.M., Wong, J., Deshane, J., Bolisetty, S., Shaposhnik, Z., Shih, D.M., Agarwal, A., Lusa, A.J., Araujo, J.A., 2007. Heme oxygenase-1 expression in macrophages plays a beneficial role in atherosclerosis. *Circ. Res.* 100, 1703–1711.
- Otterbein, L.E., Bach, F.H., Alam, J., Soares, M., Tao Lu, H., Wysk, M., Davis, R.J., Flavell, R.A., Choi, A.M., 2000. Carbon monoxide has anti-inflammatory effects involving the mitogen-activated protein kinase pathway. *Nat. Med.* 6, 422–428.
- Poss, K.D., Tonegawa, S., 1997. Reduced stress defense in heme oxygenase 1-deficient cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94, 10925–10930.
- Rufino-Palomares, E.E., Reyes-Zurita, F.J., Garcia-Salguero, L., Mokhtari, K., Medina, P.P., Lupianez, J.A., Peragon, J., 2013. Maslinic acid, a triterpenic anti-tumoural agent, interferes with cytoskeleton protein expression in HT29 human colon-cancer cells. *J. Proteome* 83, 15–25.
- Saikawa, Y., Kaneda, H., Yue, L., Shimura, S., Toma, T., Kasahara, Y., Yachie, A., Koizumi, S., 2000. Structural evidence of genomic exon-deletion mediated by Alu-Alu recombination in a human case with heme oxygenase-1 deficiency. *Hum. Mutat.* 16, 178–179.
- Sheng, H., Sun, H., 2011. Synthesis, biology and clinical significance of pentacyclic triterpenes: a multi-target approach to prevention and treatment of metabolic and vascular diseases. *Nat. Prod. Rep.* 28, 543–593.
- Soares, M.P., Lin, Y., Anrather, J., Cizmadi, E., Takigami, K., Sato, K., Grey, S.T., Colvin, R.B., Choi, A.M., Poss, K.D., Bach, F.H., 1998. Expression of heme oxygenase-1 can determine cardiac xenograft survival. *Nat. Med.* 4, 1073–1077.
- Srivastava, A., Shinn, A.S., Lee, P.J., Mannam, P., 2015. MKK3 mediates inflammatory response through modulation of mitochondrial function. *Free Radic. Biol. Med.* 83, 139–148.
- Suliman, H.B., Carraway, M.S., Velsor, L.W., Day, B.J., Ghio, A.J., Piantadosi, C.A., 2002. Rapid mtDNA deletion by oxidants in rat liver mitochondria after hemin exposure. *Free Radic. Biol. Med.* 32, 246–256.
- Sultana, N., Saify, Z.S., 2012. Naturally occurring and synthetic agents as potential anti-inflammatory and immunomodulators. *Anti-Inflamm. Anti-Allergy Agents Med. Chem.* 11, 3–19.
- Thomas, C., Pellicciari, R., Pruzanski, M., Auwerx, J., Schoonjans, K., 2008. Targeting bile-acid signalling for metabolic diseases. *Nat. Rev. Drug Discov.* 7, 678–693.
- Wagener, F.A., Feldman, E., de Witte, T., Abraham, N.G., 1997. Heme Induces the Expression of Adhesion Molecules ICAM-1, VCAM-1, and E Selectin in Vascular Endothelial Cells. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. Society for Experimental Biology and Medicine.* 216 pp. 456–463.
- Willis, D., Moore, A.R., Frederick, R., Willoughby, D.A., 1996. Heme oxygenase: a novel target for the modulation of the inflammatory response. *Nat. Med.* 2, 87–90.
- Yachie, A., Niida, Y., Wada, T., Igarashi, N., Kaneda, H., Toma, T., Ohta, K., Kasahara, Y., Koizumi, S., 1999. Oxidative stress causes enhanced endothelial cell injury in human heme oxygenase-1 deficiency. *J. Clin. Invest.* 103, 129–135.
- Yang, S.M., Hua, K.F., Lin, Y.C., Chen, A., Chang, J.M., Kuoping Chao, L., Ho, C.L., Ka, S.M., 2013. Citral is renoprotective for focal segmental glomerulosclerosis by inhibiting oxidative stress and apoptosis and activating Nrf2 pathway in mice. *PLoS One* 8, e74871.
- Zhang, X., Mosser, D.M., 2008. Macrophage activation by endogenous danger signals. *J. Pathol.* 214, 161–178.
- Zitvogel, L., Kepp, O., Galluzzi, L., Kroemer, G., 2012. Inflammasomes in carcinogenesis and anticancer immune responses. *Nat. Immunol.* 13, 343–351.